

1904 г.



# Введение в методы микроскопии в биологии.

## Оптическая микроскопия

**Алексей Валерьевич Феофанов**

*Кафедра биоинженерии*

*Биологический факультет МГУ*

*Лаборатория оптической микроскопии  
и спектроскопии биомолекул*

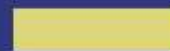
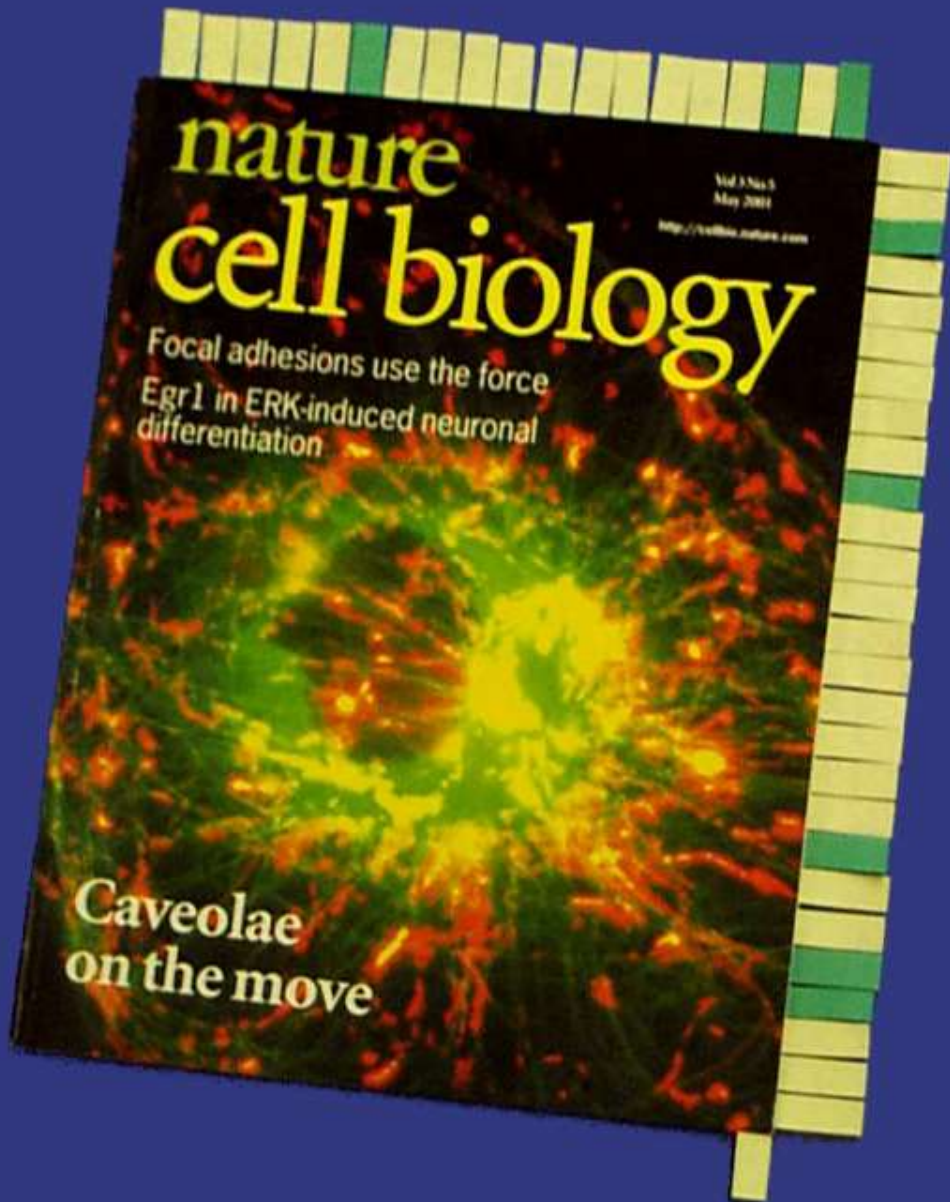
**ИБХ РАН**

**Лекция № 2**

1965 г.



# *Важность оптической микроскопии*



Оптическая  
микроскопия



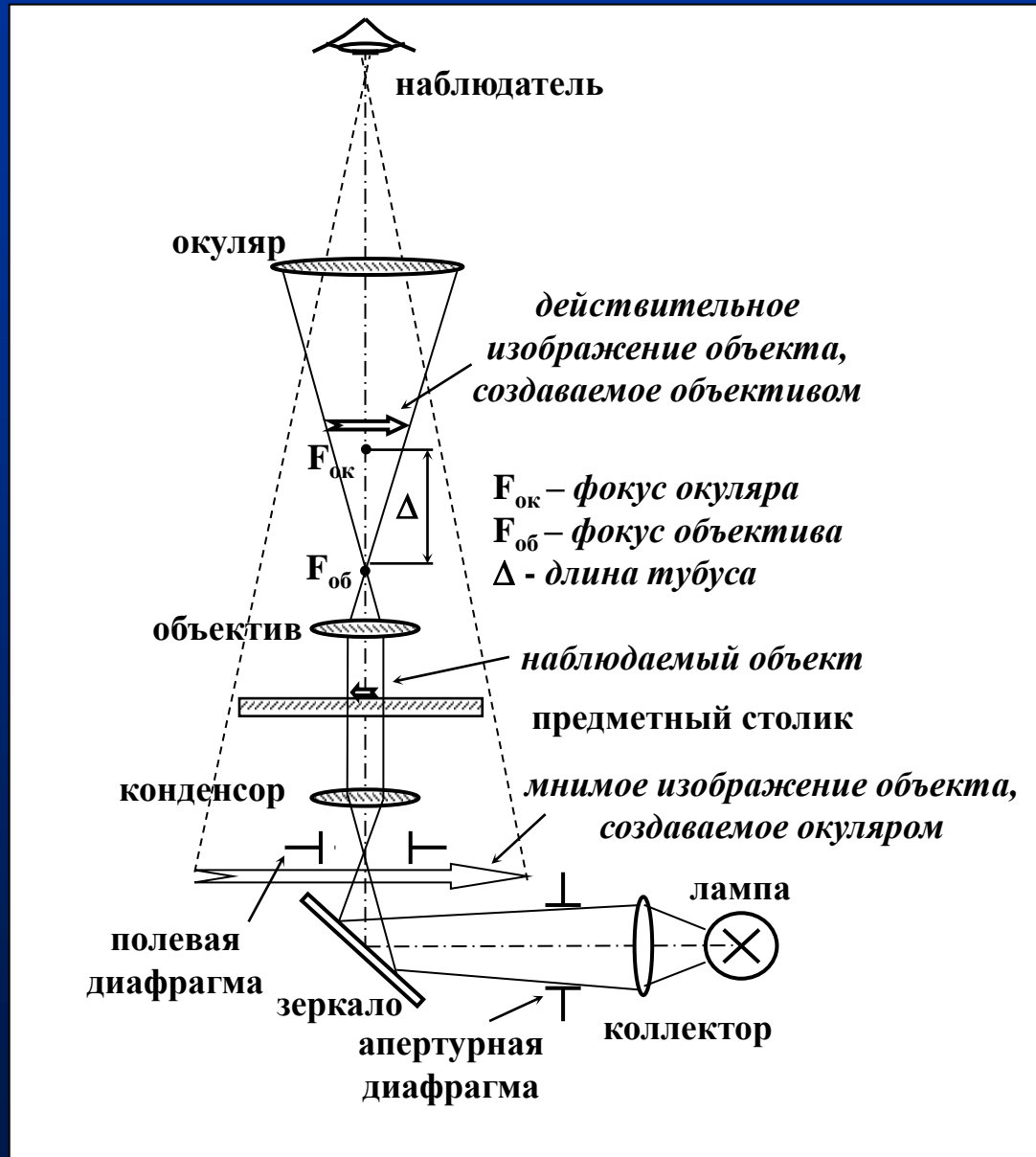
Другие методы  
микроскопии

*From Nikon presentation*

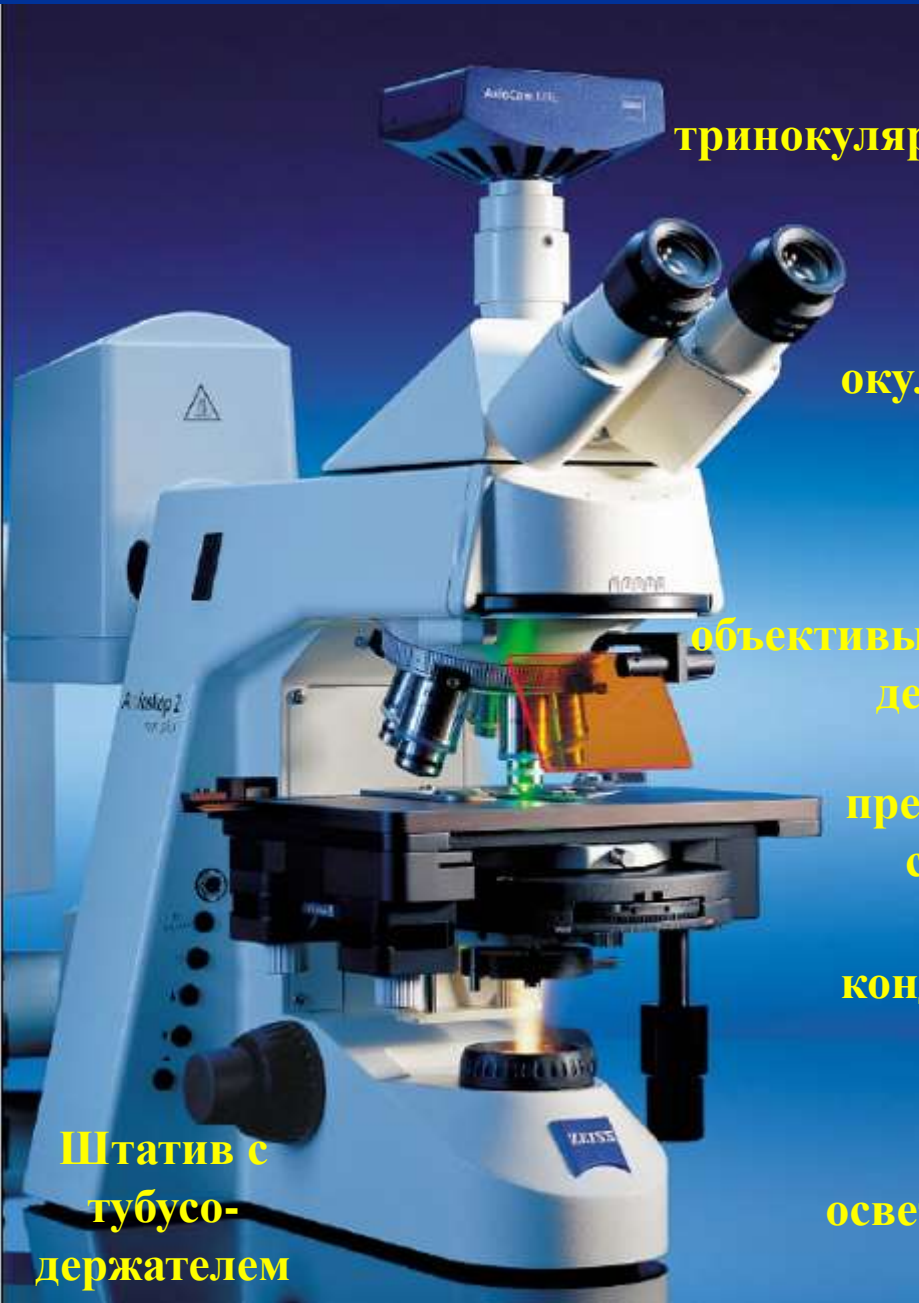
# Разнообразие методов оптической микроскопии

- Широкопольная оптическая микроскопия белого света
- Широкопольная флуоресцентная микроскопия
- Флуоресцентная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия
- Флуоресцентная лазерная сканирующая конфокальная *микроспектроскопия*
- Флуоресцентная проточная цитометрия
- Многофотонная флуоресцентная микроскопия
- Флуоресцентная корреляционная спектроскопия и микроскопия
- Флуоресцентная микроскопия на основе эффекта полного внутреннего отражения
- Флуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения (4-Пи микроскопия, STED-микроскопия на основе стимулированного обеднения эмиссии, N-SIM, N-STORM)
- Флуоресцентная микроскопия одиночных молекул и их комплексов

# Оптическая схема и принцип действия микроскопа



# Основные элементы микроскопа



тринокуляр

окуляры

объективы в револьверном  
держателе

предметный  
столик

конденсор

осветитель

Штатив с  
тубусо-  
держателем



бинокуляр

Штатив с  
тубусо-  
держателем

окуляры

объективы в револьверном  
держателе

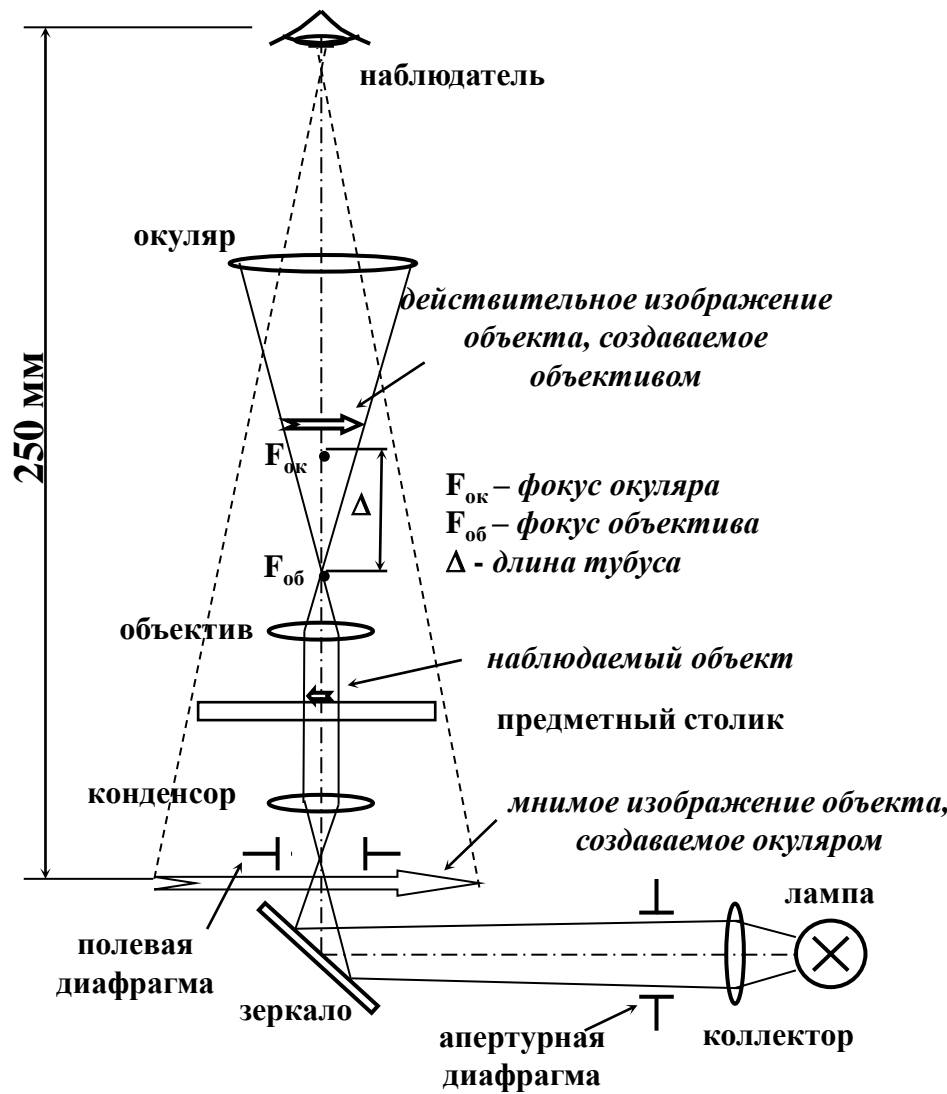
предметный  
столик

конденсор

осветитель

Штатив с  
тубусо-  
держателем

# Увеличение микроскопа



Общее увеличение микроскопа

$$\Gamma = \beta \times \Gamma_{\text{ок}} \quad \Gamma = 28 \div 1500$$

Линейное увеличение объектива:

$$\beta = \Delta / f'_{\text{об}} \quad \beta = 4 \div 100$$

$f'_{\text{об}}$  — фокусное расстояние объектива;

$\Delta$  - оптическая длина тубуса

Угловое увеличение окуляра

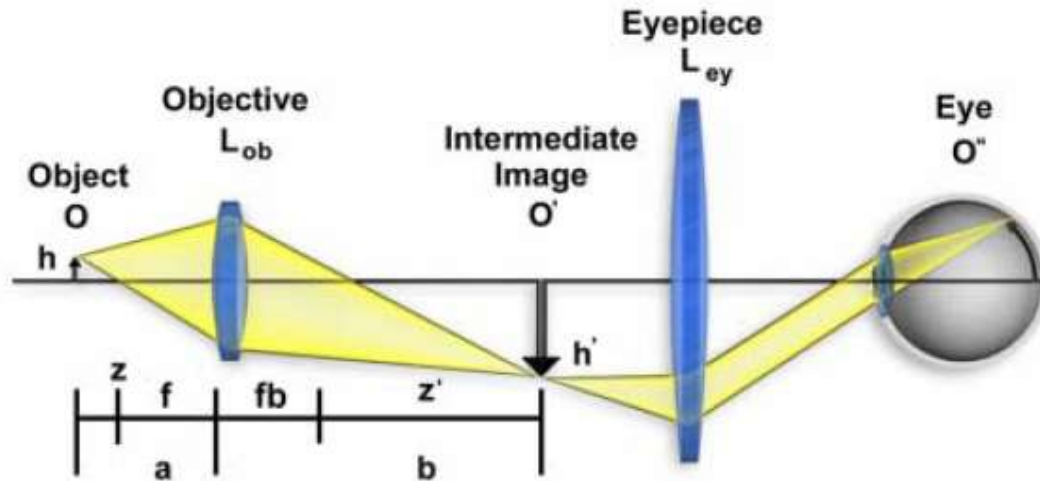
$$\Gamma_{\text{ок}} = 250 / f'_{\text{ок}} \quad \Gamma_{\text{ок}} = 7 \div 15$$

$f'_{\text{ок}}$  — фокусное расстояние окуляра

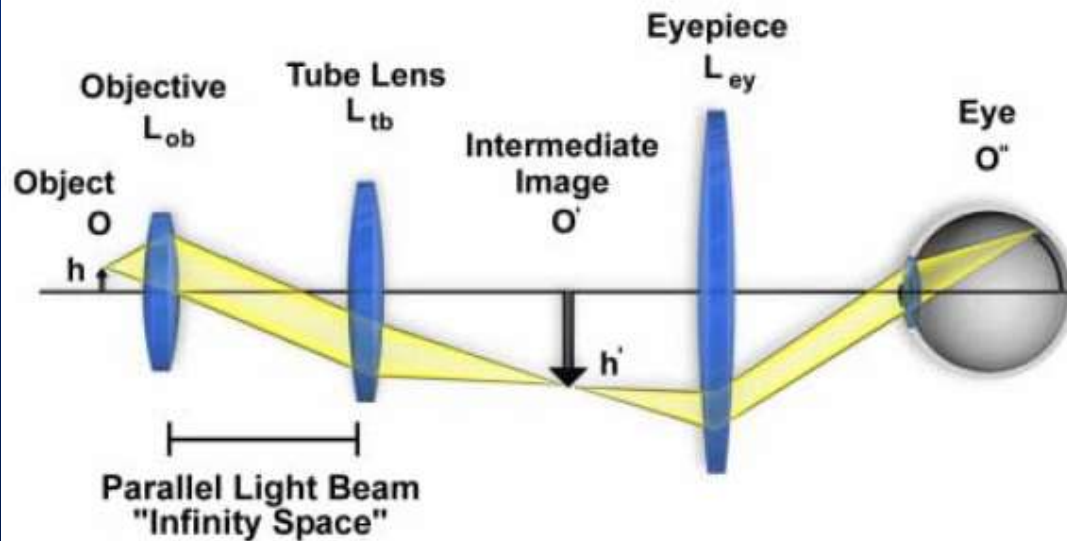
Полезное увеличение микроскопа:

$$\Gamma_{\text{пол}} = 1000 \times A$$

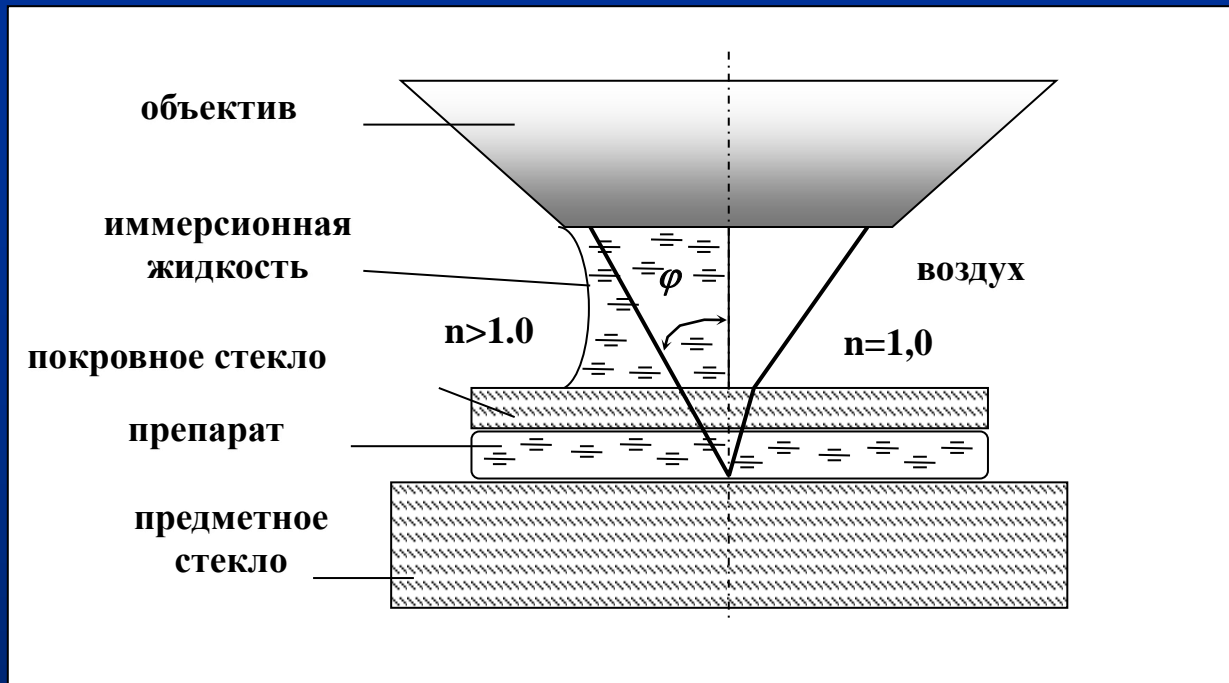
## Finite-Tube Length Microscope Ray Paths



## Infinity-Corrected Microscope Ray Paths



# Числовая апертура объектива



числовая апертура  $A = n \cdot \sin \varphi$

$n$  — показатель преломления среды

$\varphi$  — половина угла раствора светового пучка, попадающего в объектив из точки объекта.

**иммерсионные жидкости:**

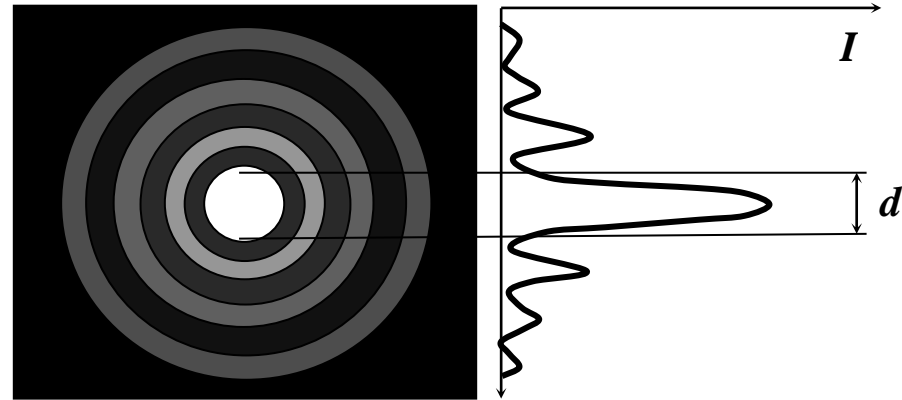
*минеральное масло ( $n=1,515$ )*

*глицерин ( $n=1,470$ )*

*вода ( $n=1,333$ )*



# Разрешающая способность микроскопа

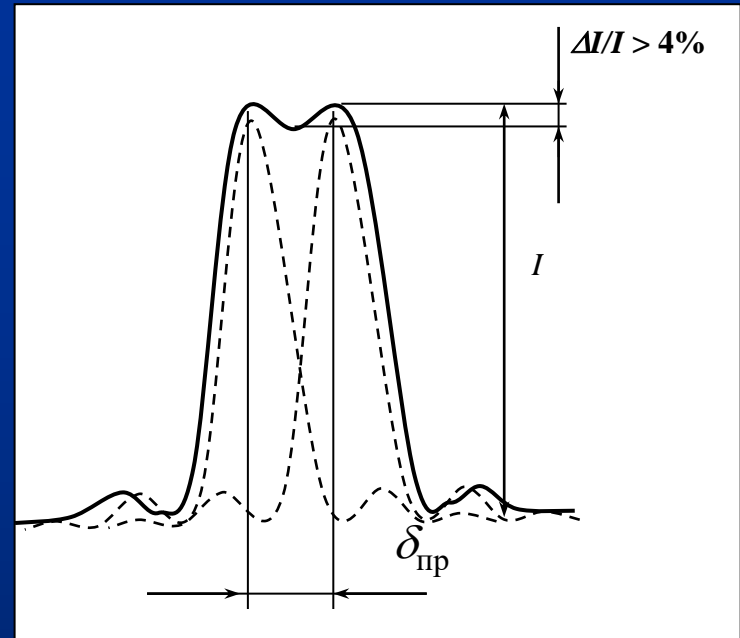


$d$  – диаметр диска Эри

$$d = 1,22 \times \lambda / A,$$

$\lambda$  - длина волны света,  $A$  —  
числовая апертура объектива

$$A = A' = 1,3; \lambda = 0,5 \text{ мкм}$$
$$\delta_{\text{пр}} = 0,2 \text{ мкм}$$



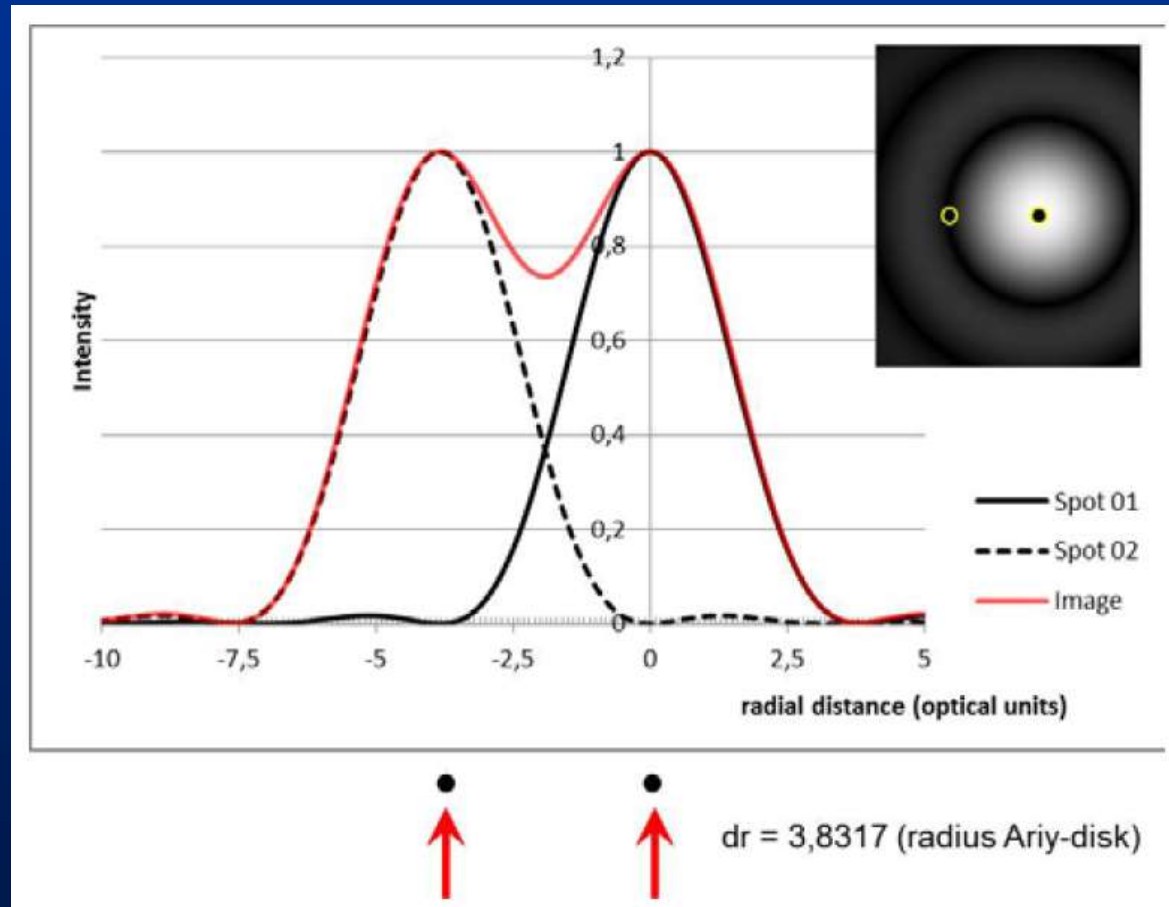
Предельное разрешение  
микроскопа

$$\delta_{\text{пр}} = 0,42 \times d = 0,51 \times \lambda / A;$$

Теория Аббе:  $\delta_{\text{пр}} = \lambda / (A + A')$ ,  
 $A'$  — числовая апертура конденсора

**Rayleigh criterion: two point-images are optically resolved if the maximum of the diffraction pattern of one emitter coincides with the first minimum of the diffraction pattern of the second emitter**

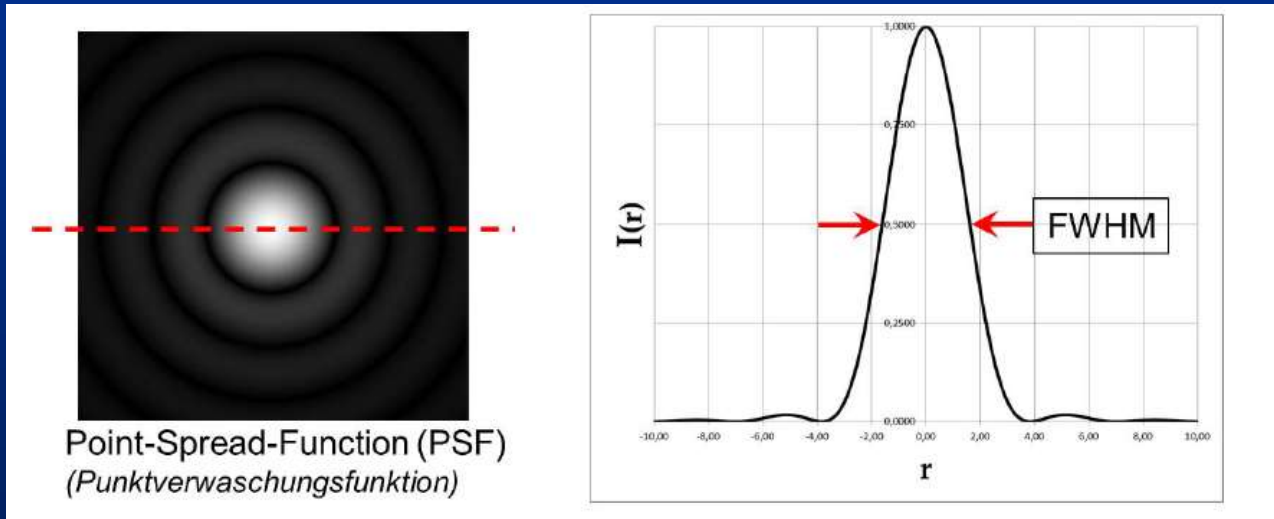
$$\delta_{\text{lim}} = 0.61 \times \lambda / A;$$



**A minimum brightness between two maxima corresponds to  $\sim 0.75$  of the maximum intensity**

More practical approach is to describe the full width at half maximum (FWHM) of an optically unresolved structure.

This value is relatively easy to measure with any microscope and has therefore become a generally accepted comparison parameter



$$\delta_{\text{lim}} = 0.51 \times \lambda / A;$$

# Ключевые параметры объективов

## Увеличение и числовая апертура объектива

*Увеличение объектива* определяет размер деталей изображения на сетчатке глаза, фотопленке или сенсоре цифровой фотокамеры

*Увеличение объектива* определяет размер области объекта, которую можно наблюдать.

Если у 2 х объектива область зрения – 10 мм, то

у 10 х объектива – 2 мм

у 100 х объектива – 200 мкм

**Диапазон увеличений современных объективов: 1х – 250х**

**Увеличение само по себе не определяет разрешение объектива**

# Ключевые параметры объективов

## Увеличение и числовая апертура объектива

*Числовая апертура* определяет разрешающую способность объектива

*Числовая апертура и увеличение* определяют яркость изображения ( $B$ ) объекта при наблюдении в микроскоп

- в режиме проходящего света яркость изображения зависит от числовой апертуры объектива  $A$ , числовой апертуры конденсора  $A'$  и общего увеличения микроскопа  $\Gamma$ , как

$$B \sim (A \times A')^2 / \Gamma^2$$

# Ключевые параметры объективов

## Увеличение и числовая апертура объектива

### Что важнее увеличение или апертура?

- Сложно обеспечить большую числовую апертуру для объективов с низким увеличением.
- Чем больше увеличение объектива, тем больше может быть апертура.
- Существуют объективы с одинаковым увеличением, но с разной апертурой!
- Выбрав объектив по параметру «увеличение», необходимо проверить, обеспечивает ли числовая апертура этого объектива требуемое разрешение

у **10** х объективов

числовая апертура варьирует

от **0,2** до **0,5**

а разрешение ( $\lambda=0,5$  мкм) при этом меняется

от **1,3** до **0,5** мкм.

- **Повышение числовой апертуры объективов с небольшим увеличением - важное направление развития современной оптики**
- **Такие объективы облегчают детальные исследования протяженных объектов (срезы тканей, многоклеточные организмы и т.п.), а также позволяют одновременно наблюдать за большим количеством мелких объектов (клеток эукариот, бактерий и т.п.)**
- **Примеры:**
  - **10x суховоздушный  $A=0,5$**
  - **20x маслоиммерсионный  $A=1,0$**
  - **40x маслоиммерсионный  $A=1,3$**
- **В этих разработках лидирует фирма Zeiss (Германия).**

## «Предельные» числовые апертуры объективов

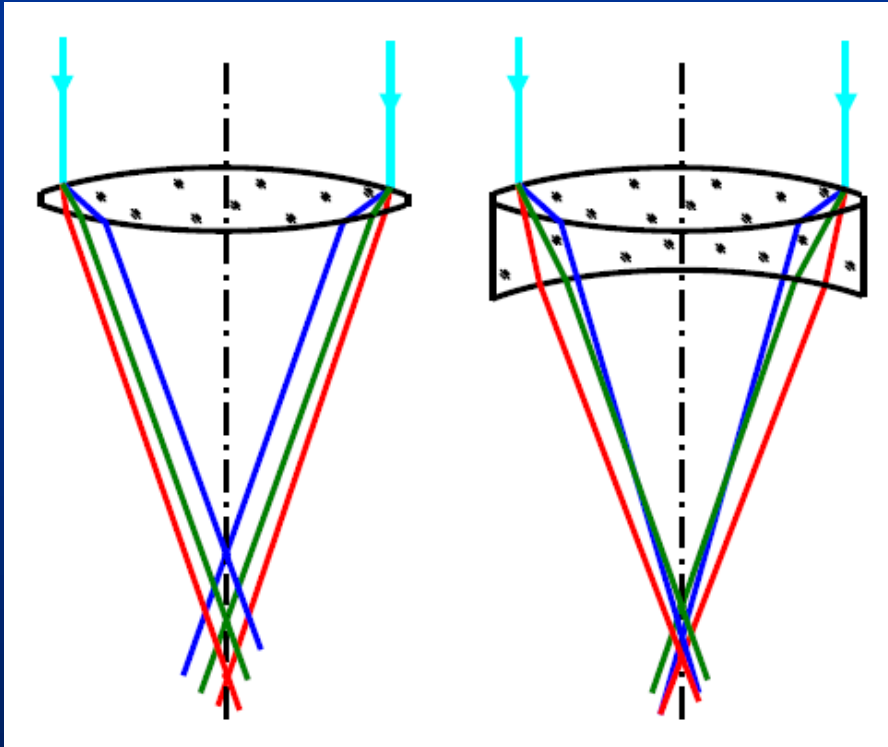
- **числовая апертура объективов с воздушным зазором (сухо-воздушных объективов) не превышает 0,95**
- **Рекорд: 100x маслоиммерсионный объектив  $A=1,65$  (Olympus, Япония). Предельное разрешение ( $\lambda=0,5$  мкм)- 0,16 мкм.**
- **Следует отметить:**
  - **60x маслоиммерсионный  $A=1,49$  (Nikon, Япония),**
  - **63x маслоиммерсионный  $A=1,47$  (Leica, Германия),**
  - **63x маслоиммерсионный  $A=1,46$  (Zeiss, Германия).**
- **В исследовательской практике очень широко применяются**
  - **60x и 63x объективы  $A=1,2-1,4$ ,**
  - **100x объективы  $A=1,3-1,4$ .**



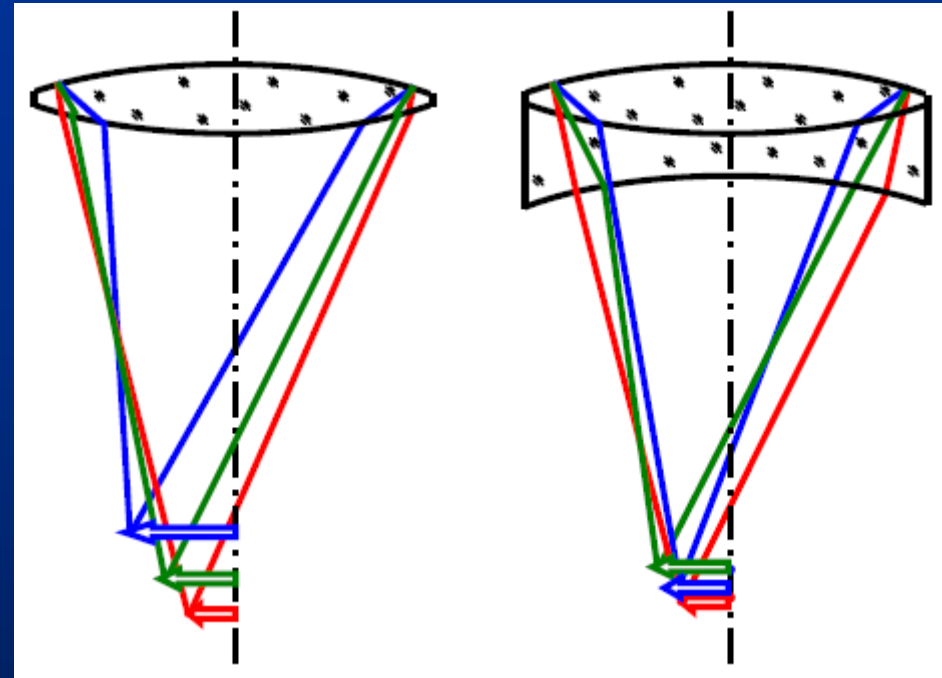
# Ключевые параметры объективов

## Погрешности оптического изображения

(1) хроматическая aberrация положения и размера; (2) кривизна поля изображения



**Хроматическая aberrация положения и ее исправление с помощью ахроматического дублета для двух длин волн**



**Хроматическая aberrация размера и ее исправление с помощью ахроматического дублета для двух длин волн**

# Ключевые параметры объективов

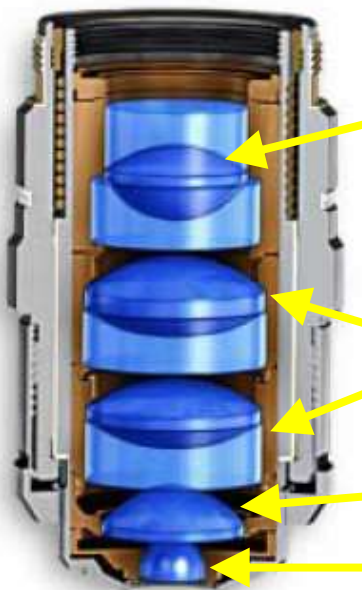
степень коррекции хроматических aberrаций



ахромат



полу-апохромат  
(флуорит)



триплет

дублет

менисковая линза

фронтальная линза

Объективы, в которых хроматические aberrации исправлены на двух длинах волн, имеют в своем названии приставку «ахромат» и называются ахроматами.

Объективы, в которых хроматические aberrации исправлены на трех длинах волн, имеют в своем названии приставку «апохромат» и называются апохроматами

# Ключевые параметры объективов

## Рабочее расстояние объектива

- Рабочее расстояние ( $WD$ ) характеризует, на сколько глубоко можно «заглянуть» внутрь прозрачного объекта с помощью этого объектива, перестраивая фокус.
- Чем больше числовая апертура объектива, тем меньше его рабочее расстояние.

Например, у 10х объективов

$$A=0,2 \quad WD=17,1 \text{ мм}$$

$$A=0,25 \quad WD=4,4 \text{ мм}$$

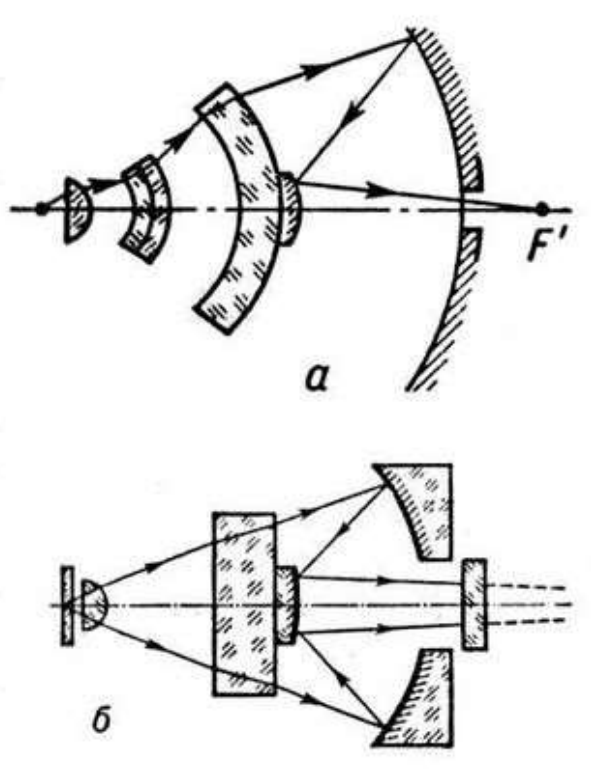
$$A=0,5 \quad WD= 1,9 \text{ мм}$$

- Для объективов с большим увеличением и высокой числовой апертурой рабочие расстояния очень малы.

Например, у 60х и 100х объективов

$$A=1,2-1,4 \quad WD=150-300 \text{ мкм.}$$

# Ключевые параметры объективов



Оптические схемы  
иммерсионных  
зеркально-линзовых  
объективов для УФ  
диапазона

Объективы различаются:

по спектральным характеристикам:  
*для видимой области, для УФ и ИК  
микроскопии (линзовые или зеркально-линзовые)*

по длине тубуса:

*160 мм, 190 мм, бесконечность;*

по иммерсии:

*сухие и иммерсионные;*

по методу наблюдения:

*обычные, фазово-контрастные,  
интерференционные и др.;*

по типу препаратов:

*с покровным стеклом и без него с коррекцией  
на толщину покровного стекла или без нее*

по коррекции кривизны изображения:

*планахроматы, планапохроматы;*

# Маркировка объективов

## Обозначение объектива

Тип объектива и спец. свойства  
(LD и т.п.)

увеличение/числовая апертура;  
иммерсии W(ater)/Oil/Glyc(erin)  
коррекция толщины стекла

длина тубуса/толщина стекла

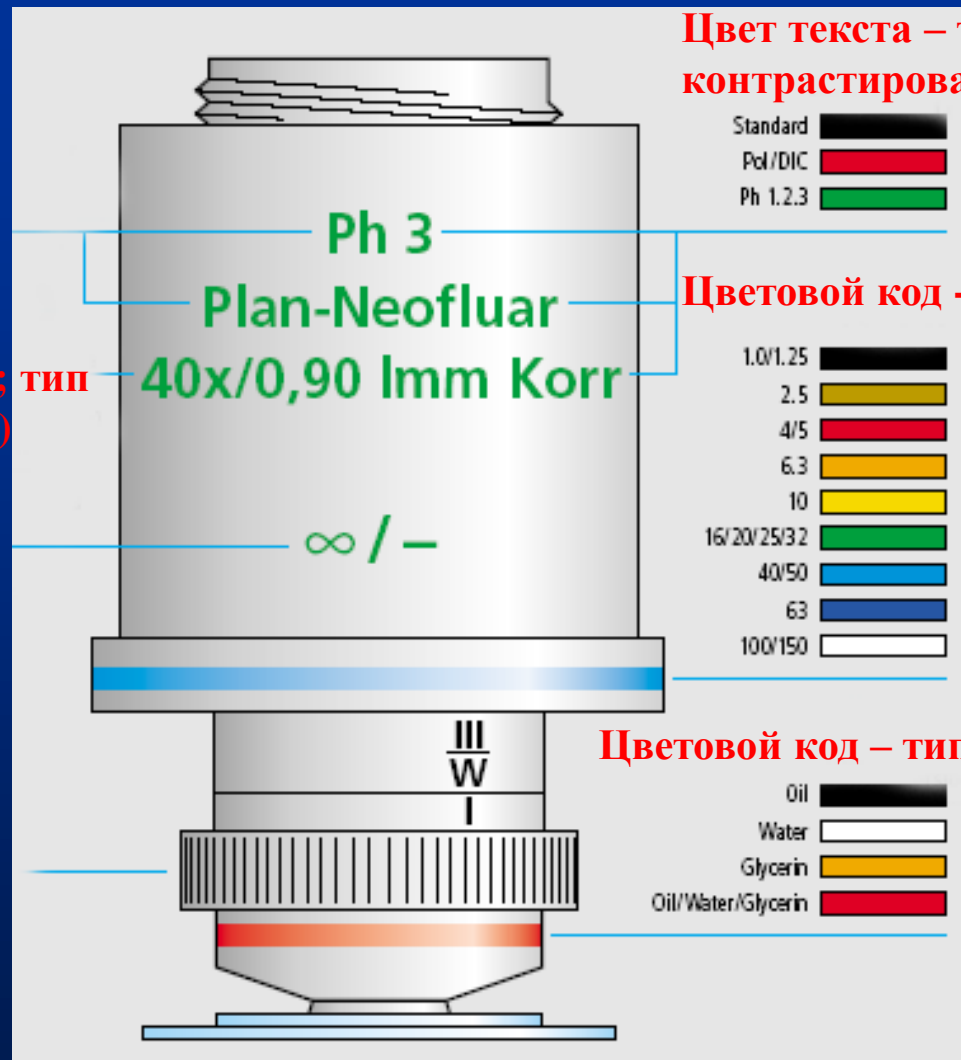
0.17 – стандартное

0 – без стекла

-- на любую толщину

Мех. функц. кольцо

для коррекции: толщины стекла;  
иммерсии;  
апертуры



Цвет текста – тип метода контрастирования

Цветовой код - увеличение

Цветовой код – тип иммерсии

# Конденсоры



Отличаются

по числовой апертуре (0,2-1,4);  
суховоздушные  $A < 0,9$   
иммерсионные  $0,9 < A < 1,4$   
рабочему расстоянию;  
по коррекции кривизны поля  
и хроматических aberrаций  
(требуется при  $A > 0,5$ )

коррекция кривизны поля – апланарные

коррекция хроматических aberrаций – ахроматические

Тип применяемого конденсора зависит от выбора метода наблюдения

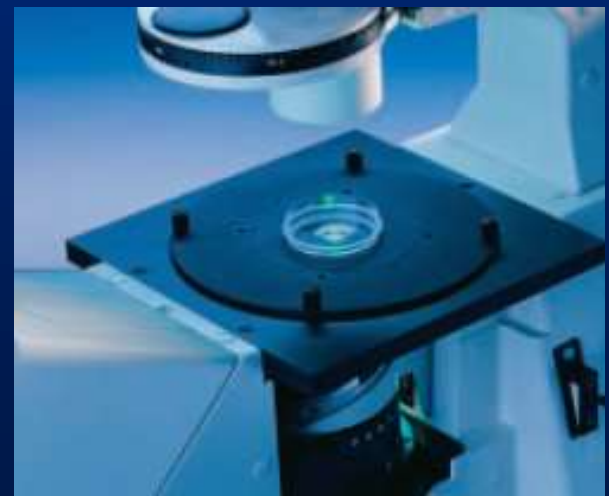
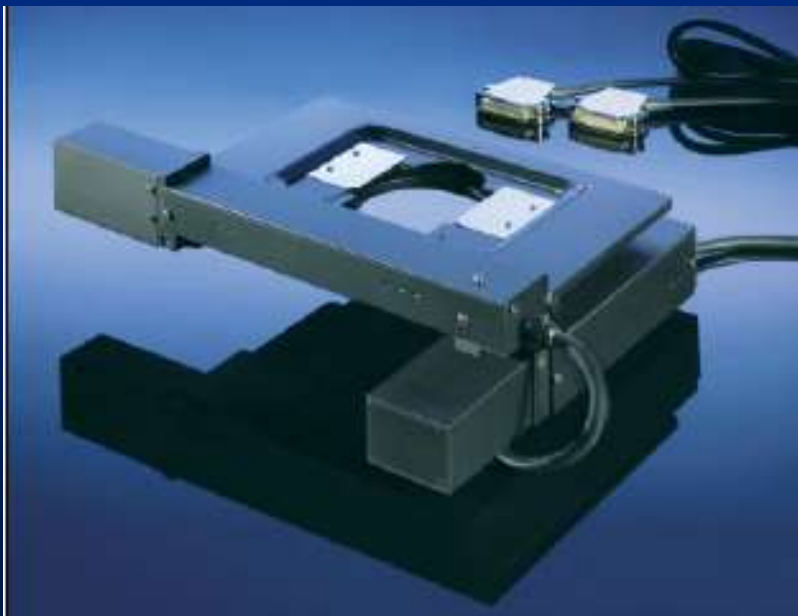
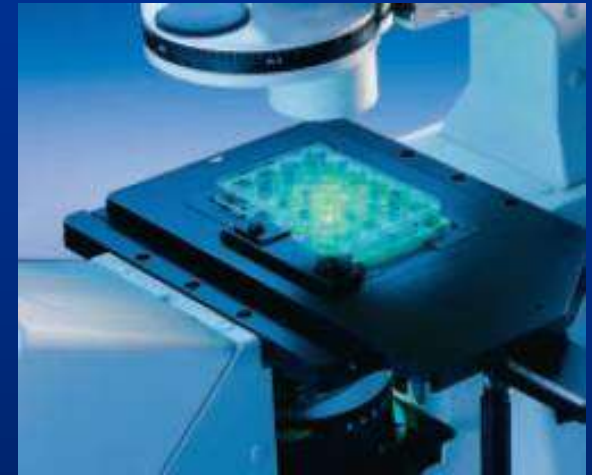
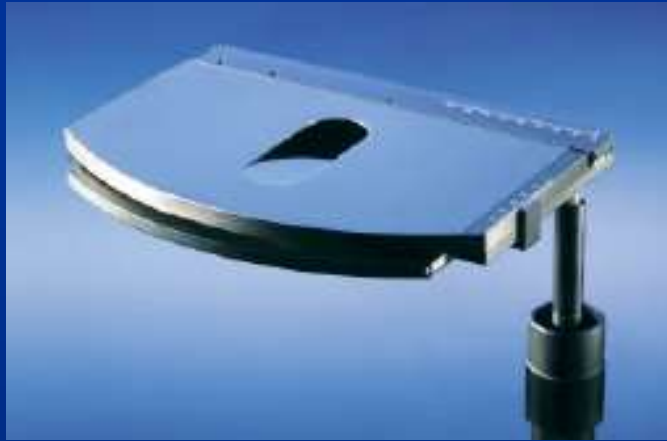
Светлопольные конденсоры ( $A < 1.4$ ) имеют апертурную ирисовую диафрагму;  
смещение диафрагмы в сторону- косое освещение препарата;

Фазово-контрастные конденсоры снабжены кольцевыми диафрагмами

Конденсоры для интерференционного контраста - снабжены специальными  
оптическими элементами

Темнопольные конденсоры- сложные системы из линз и зеркал.

# Предметные столики



# Классификация микроскопов

- **По областям применения:** технические, биологические, хирургические.
- **По классу сложности:** учебные и рабочие, лабораторные, исследовательские.
- **По виду микроскопии:** проходящего и отраженного света, поляризационные, люминесцентные, фазового контраста, лазерные конфокальные
- **По направленности светового потока** прямые и инвертированные



## Типы микроскопов



Прямой микроскоп для наблюдения объектов в проходящем свете



стереомикроскоп



микроскоп для наблюдения объектов в отраженном свете



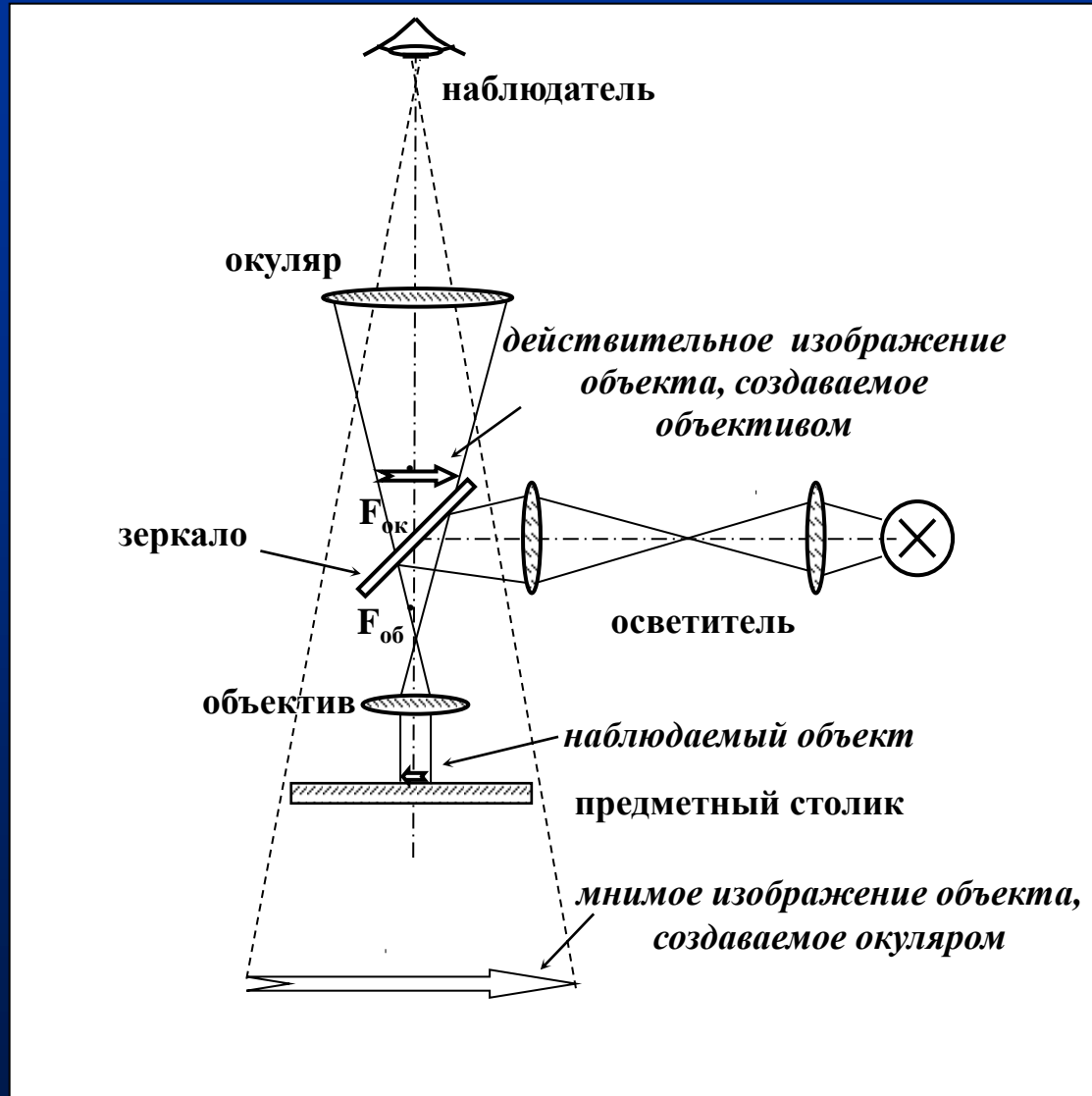
Инvertированный микроскоп для наблюдения в проходящем свете



Комбинированный прямой микроскоп для наблюдения в проходящем и отраженном свете



# Метод наблюдения объекта в отражённом свете



# Разрешение микроскопа и яркость изображения в режиме отраженного света

Предельное разрешение микроскопа

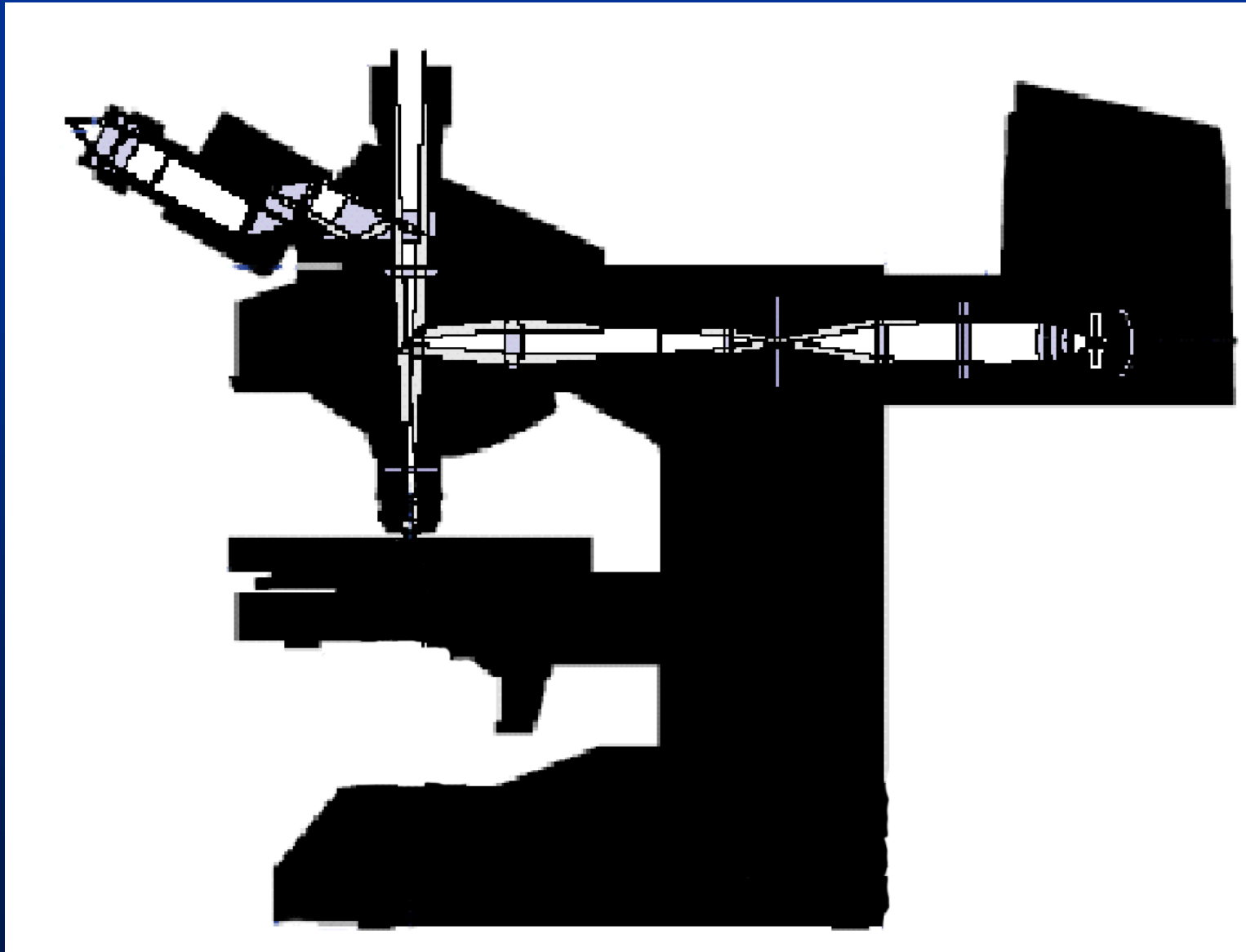
$$\delta_{\text{пр}} = 0,51 \times \lambda / A$$

Яркость изображения ( $B$ ) объекта при наблюдении в микроскоп

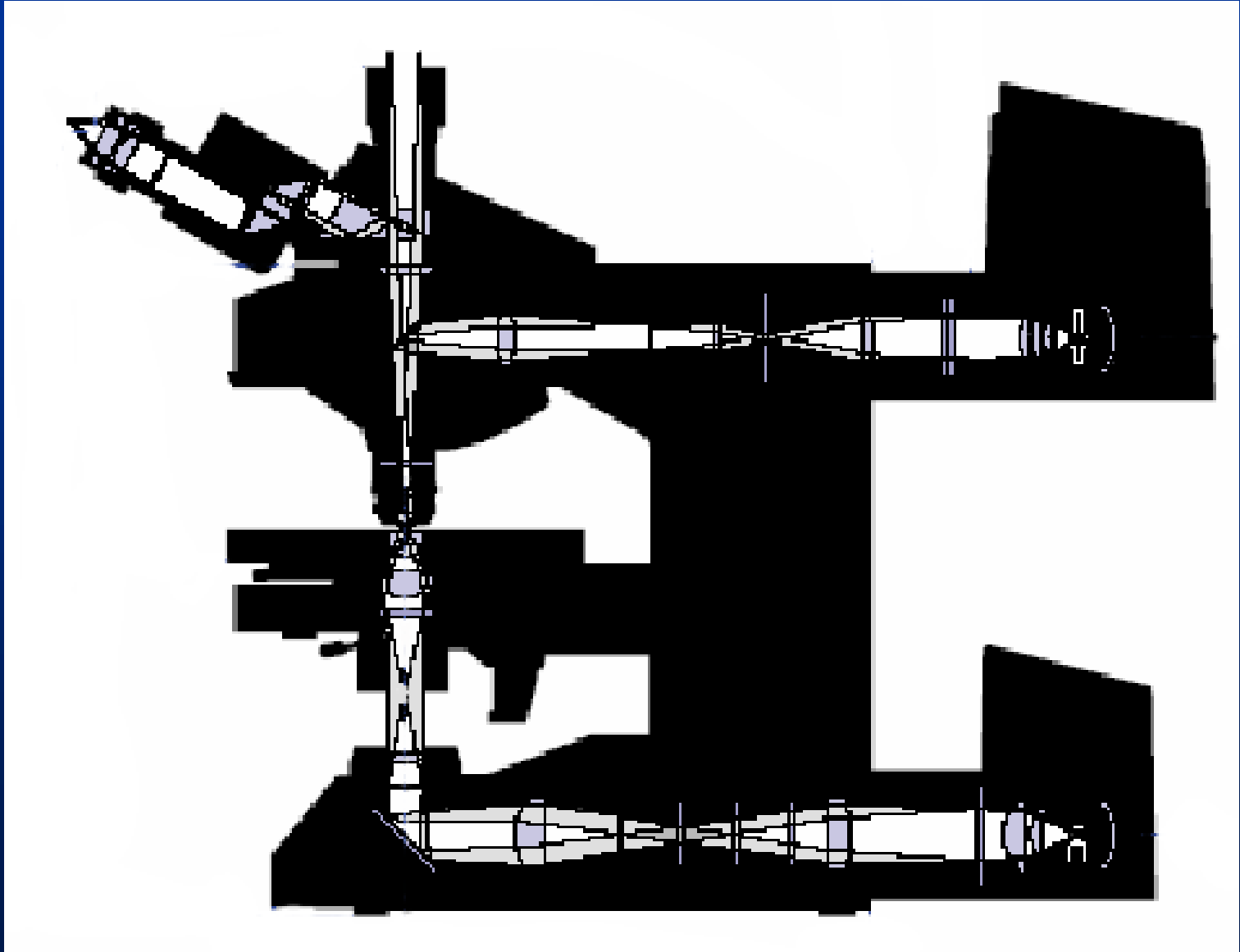
$$B \sim A^4 / \Gamma^2 ,$$

$\Gamma$  - общее увеличение микроскопа

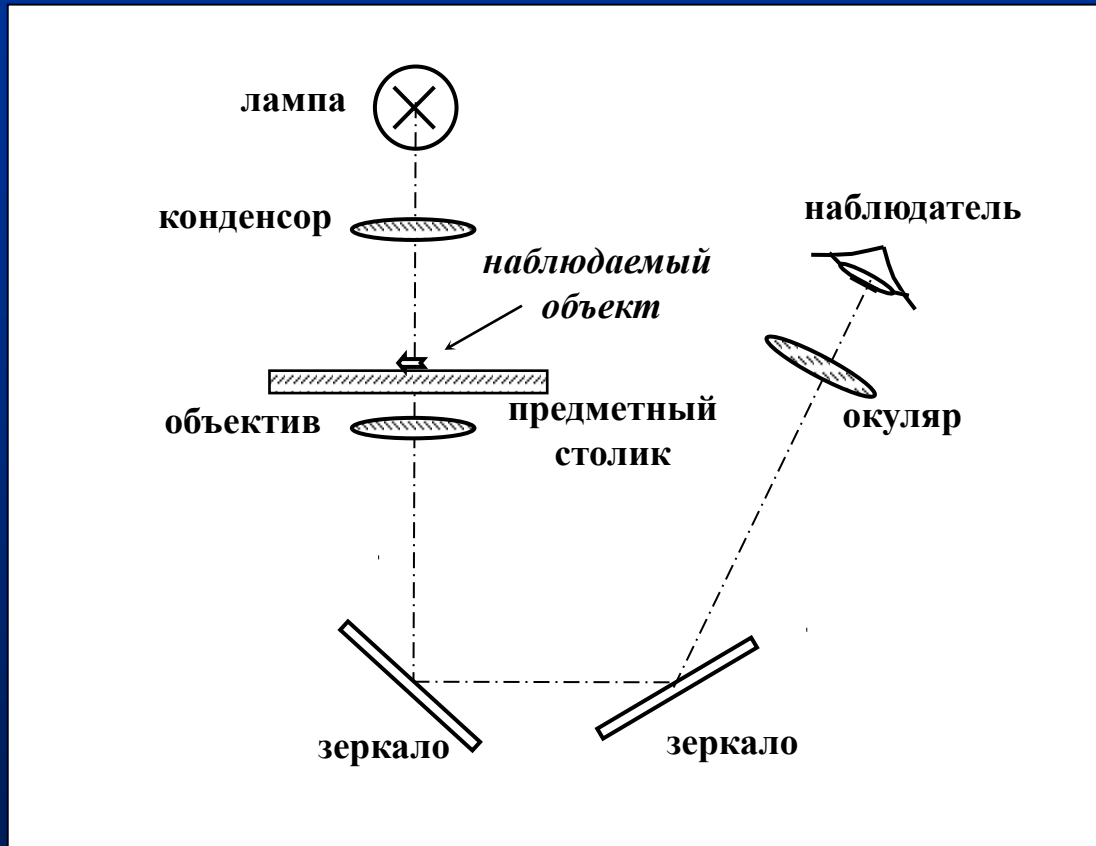
Схема хода лучей в *прямом* микроскопе  
при наблюдении объекта в *отраженном* белом свете



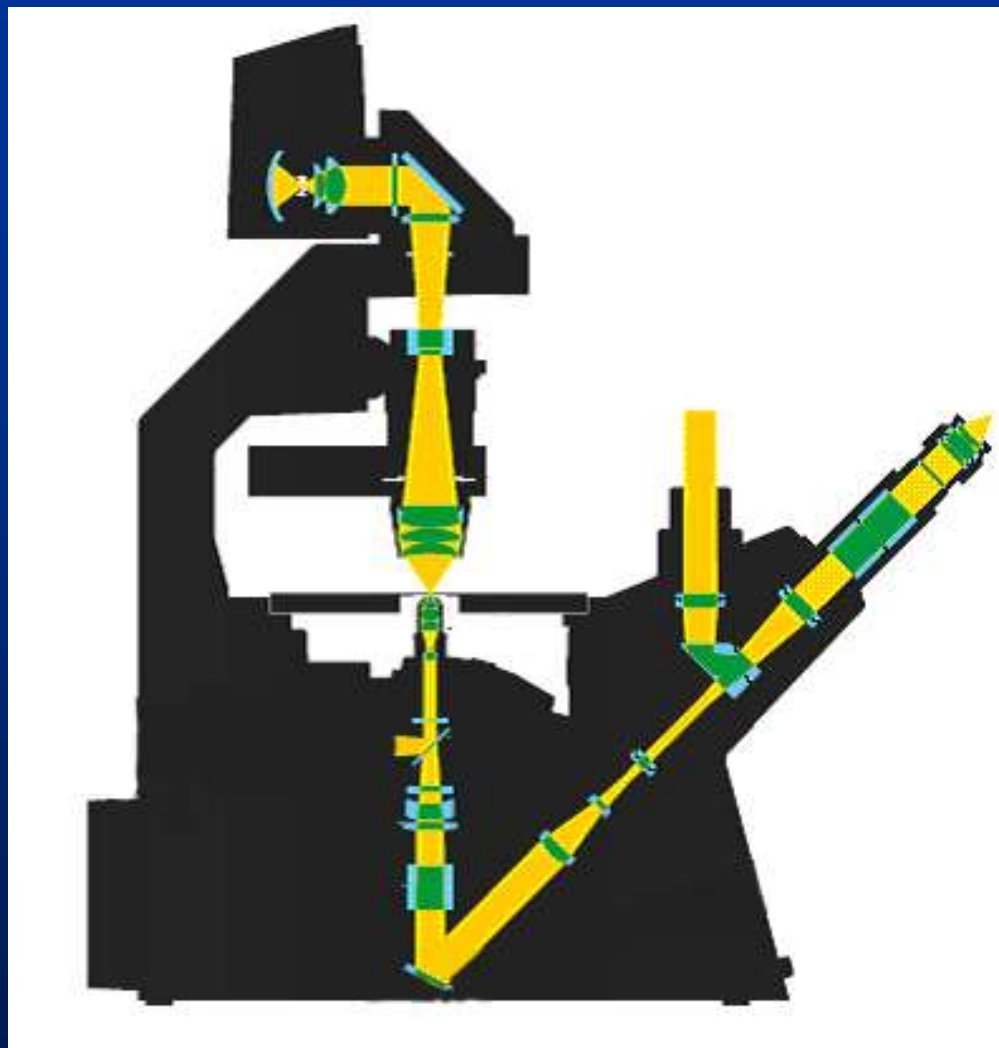
**Схема хода лучей в *прямом* микроскопе 2-мя осветителями для наблюдения объекта в *проходящем* или *отраженном* белом свете**



# Принципиальная оптическая схема инвертированного микроскопа

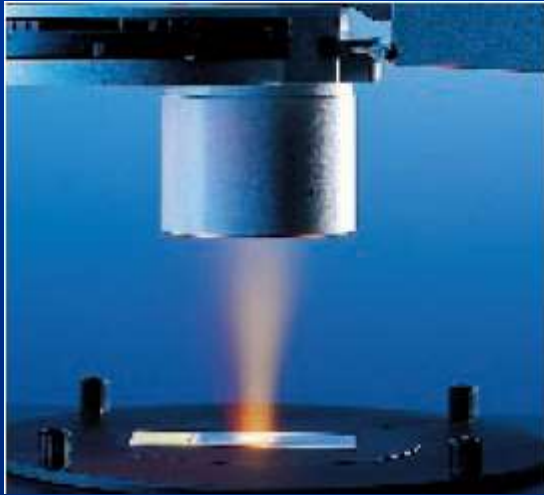


# Оптическая схема инвертированного микроскопа





## Конденсоры для инвертированных микроскопов



$A=0.35$ ;  $WD=70$  мм



$A=0.55$ ;  $WD=26$  мм



$A=0.8$ ;  $WD=7$  мм

**Преимущество: возможность манипуляций с образцами в процессе измерений;**

**наблюдение клеток без нарушения стерильности в чашках Петри, планшетах и т.п.**

## Типы микроскопов



Прямой микроскоп для наблюдения объектов в проходящем свете



микроскоп для наблюдения объектов в отраженном свете

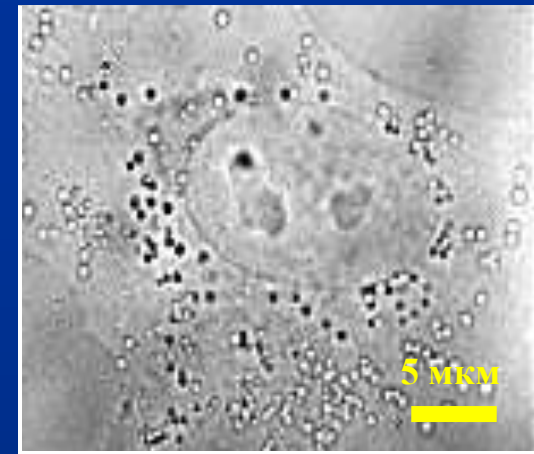
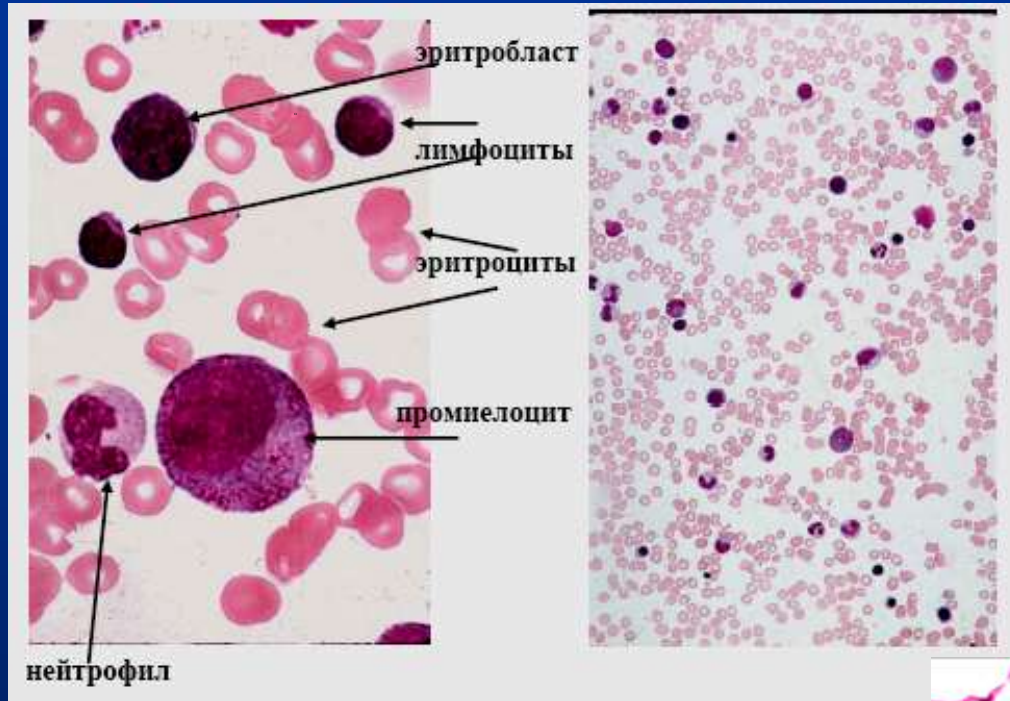


Инvertированный микроскоп для наблюдения в проходящем свете



Комбинированный прямой микроскоп для наблюдения в проходящем и отраженном свете

# Микрофотографии клеток крови, окрашенных гистохимическими красителями

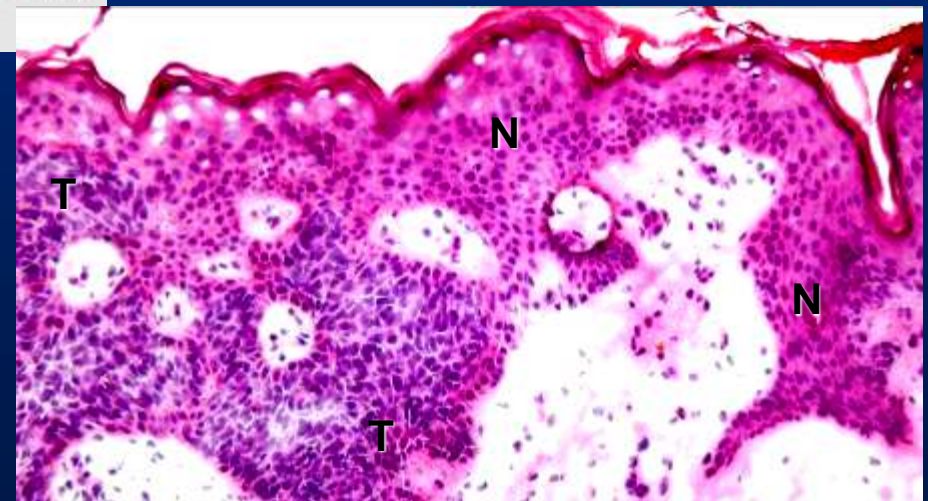


Микрофотография клетки в  
проходящем белом свете 100×  
маслоиммерсионный  
Объектив, A=1,3

Объекты:

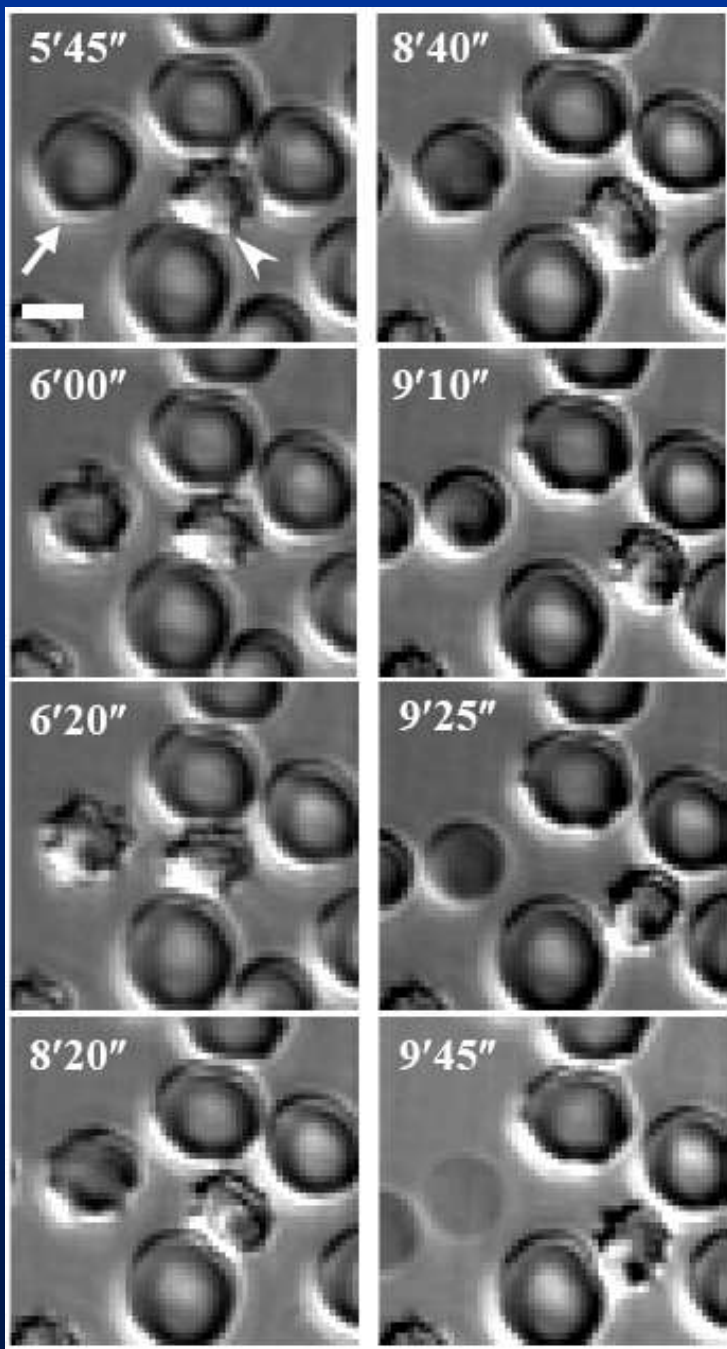
Амплитудные

Срез ткани (эпителий),  
окрашенный гистохимическими  
красителями



T - саркома

# Анализ кренирования эритроцитов под действием антимикробного пептида латарцина Ltc2a в режиме реального времени



Изображения получены в режиме проходящего белого света

ДИСКОЦИТ-

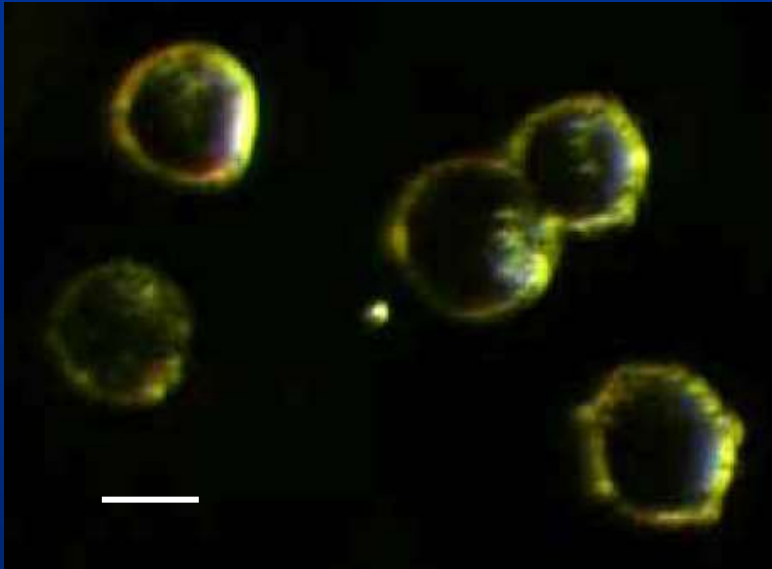
ЭХИНОЦИТ –

сфероцит -

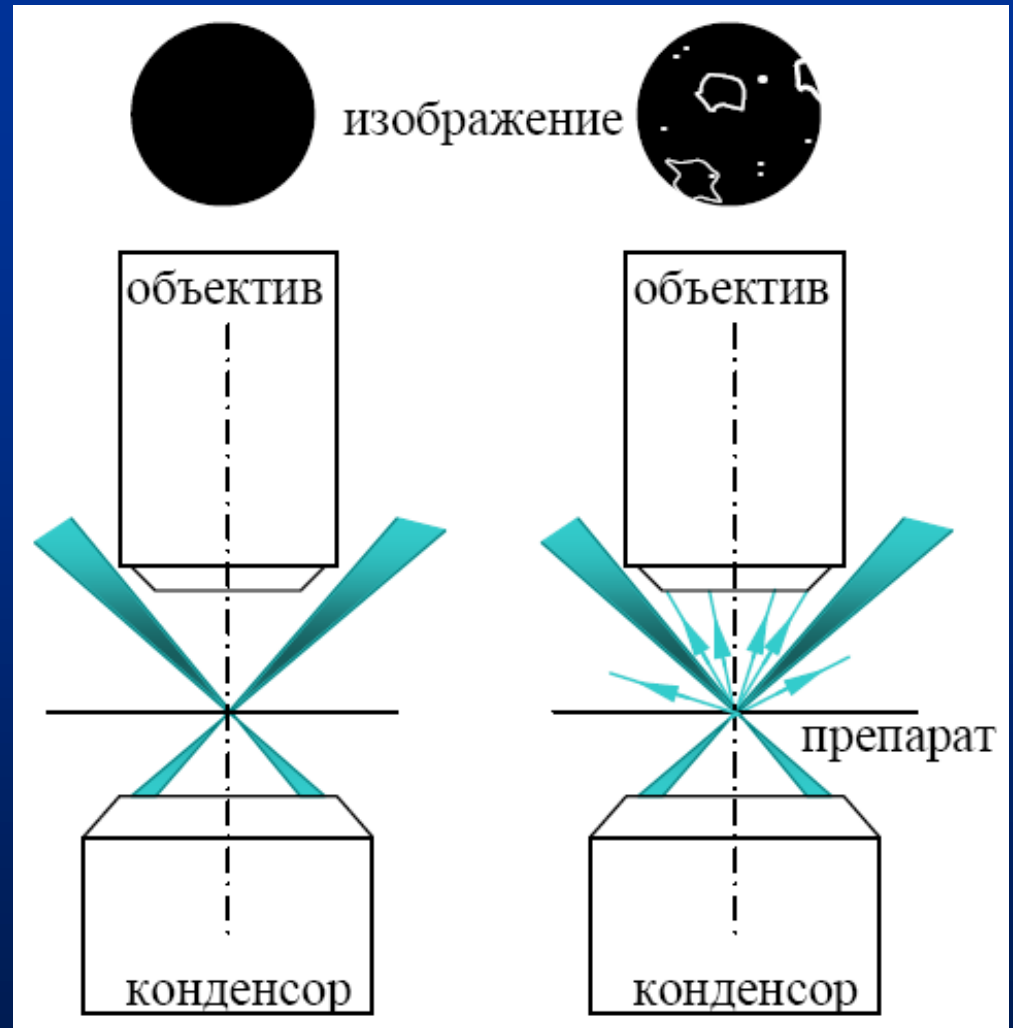
тень

# Метод тёмного поля в проходящем свете

Объекты: Фазовые



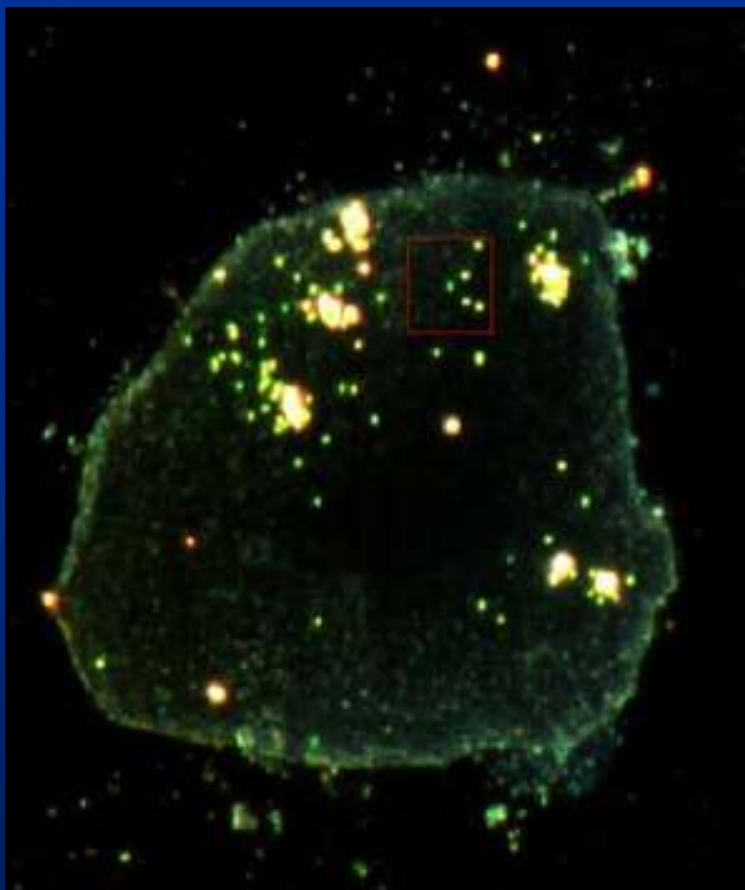
метод применяется для получения изображений прозрачных не поглощающих объектов, невидимых при освещении по методу светлого поля



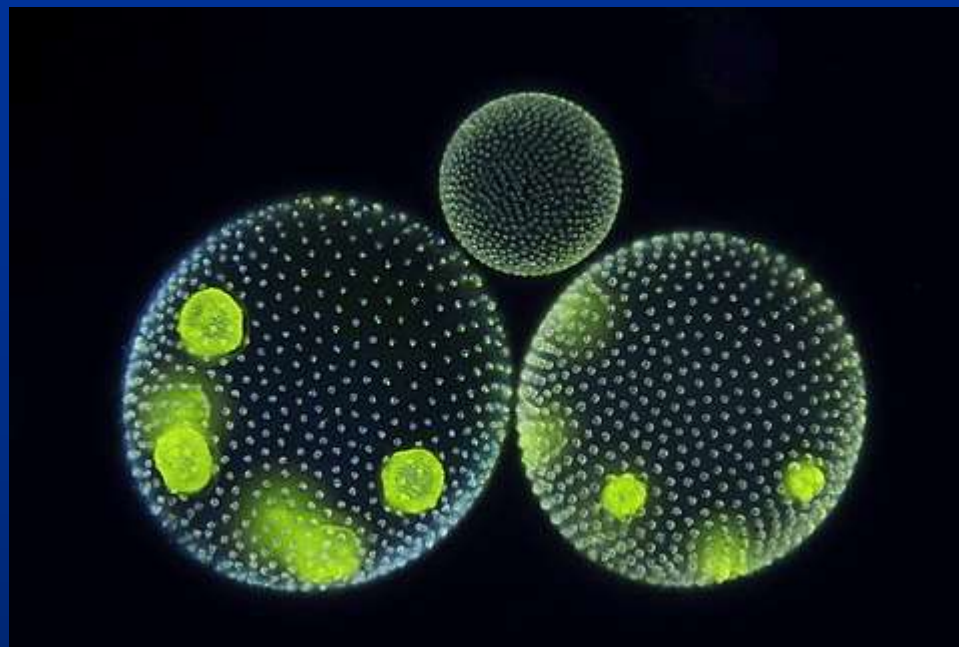
в отсутствии препарата свет не попадает в объектив

свет дифрагирует на неоднородностях препарата и попадает в объектив

## Метод тёмного поля в проходящем свете



Распределение наночастиц  
золота в эпителиальной  
клетке



Шаровидные колонии  
зеленых водорослей рода  
Вольвокс

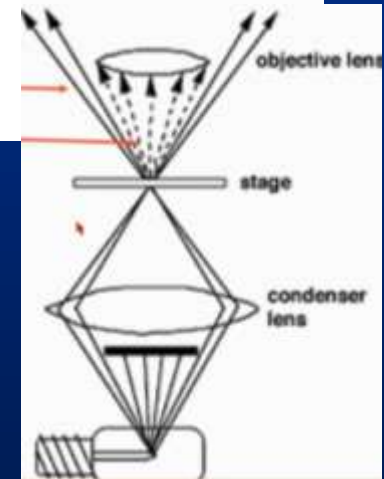
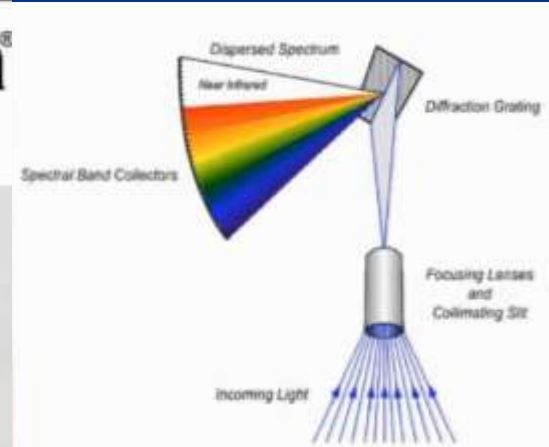
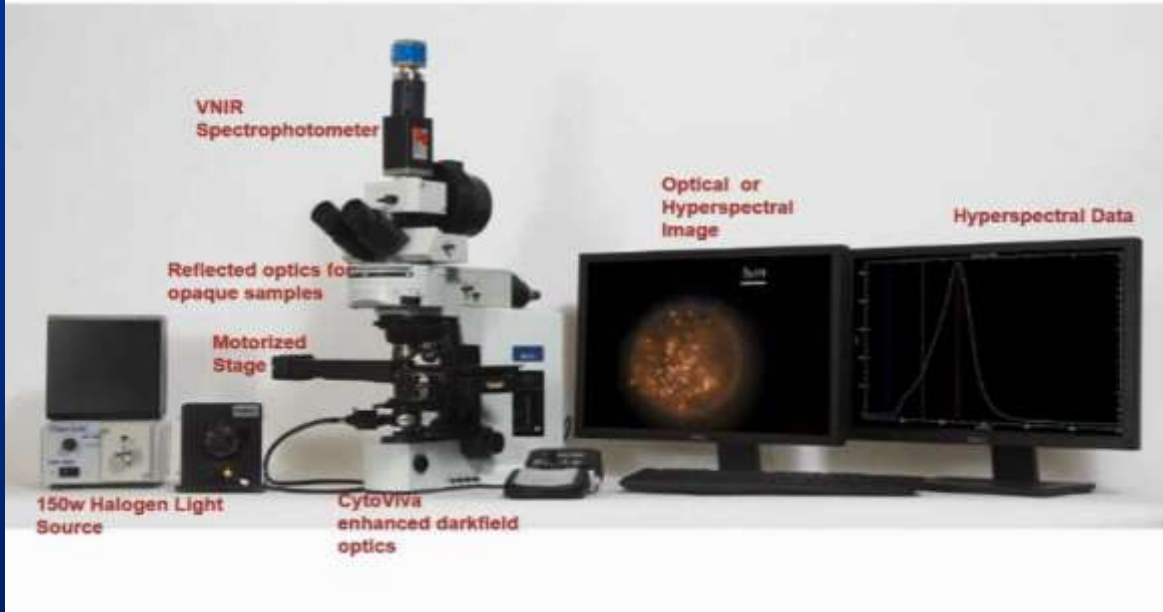
[www.robertharding.com](http://www.robertharding.com)

# Dark-field hyperspectral imaging analysis

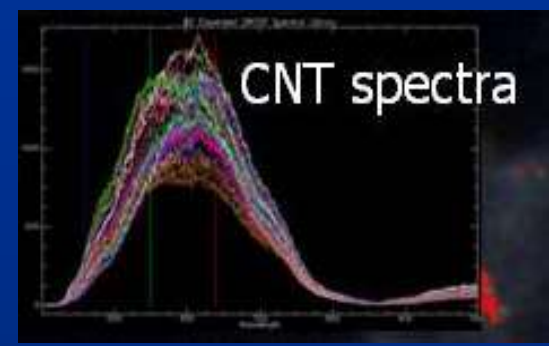
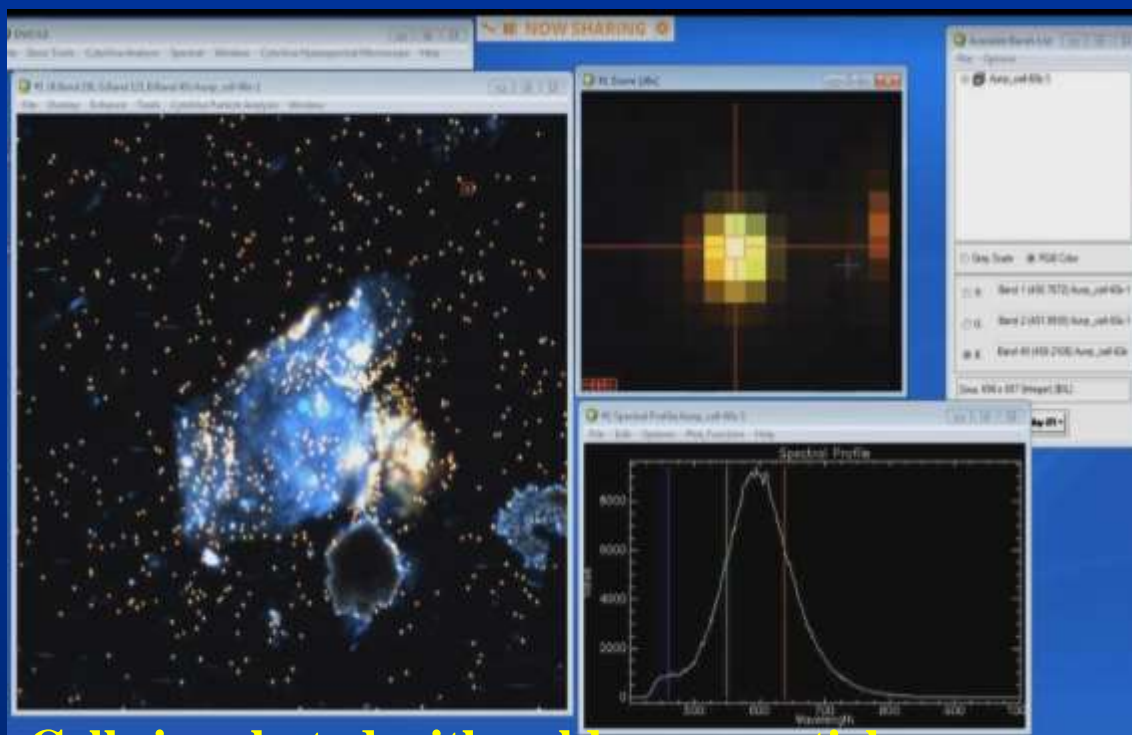
NOW SHARING

## CytoViva®

### CytoViva System

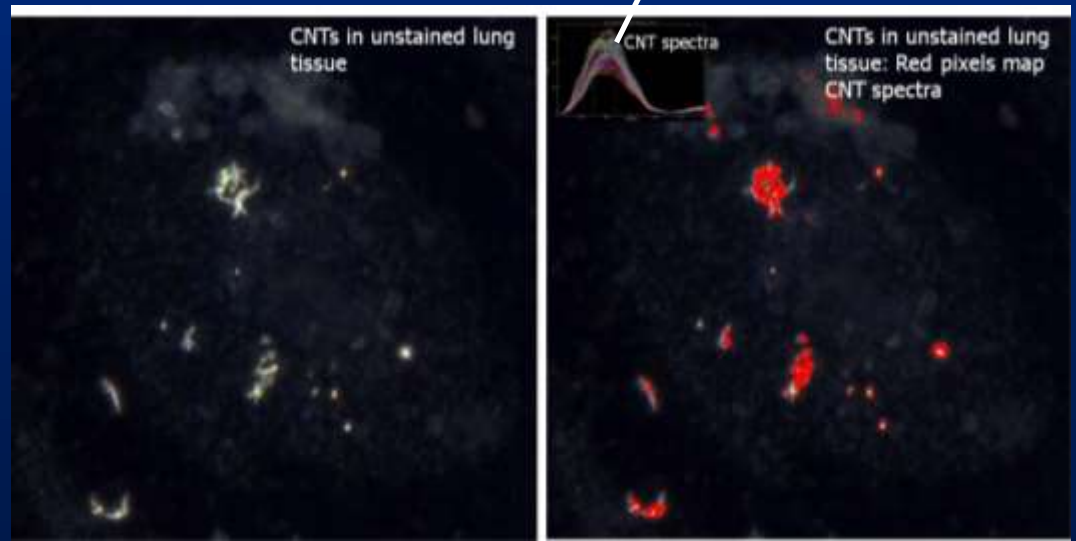


<http://cytoviva.com/>



**Cells incubated with gold nanoparticles**

**carbon nanotubes in unstained lung tissues**





# Метод ультрамикроскопии

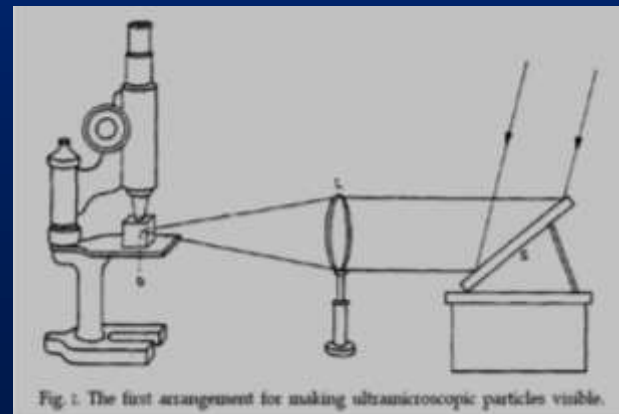
**Освещение препаратов - перпендикулярно направлению наблюдения.**

**Появление дифракционных пятен - возможность обнаружить частицы размером до 2 нм.**

**Определить форму и точные размеры частиц невозможно, т.к. размеры дифракционных пятен зависят не от размеров и формы частиц, а от апертуры и увеличения объектива.**

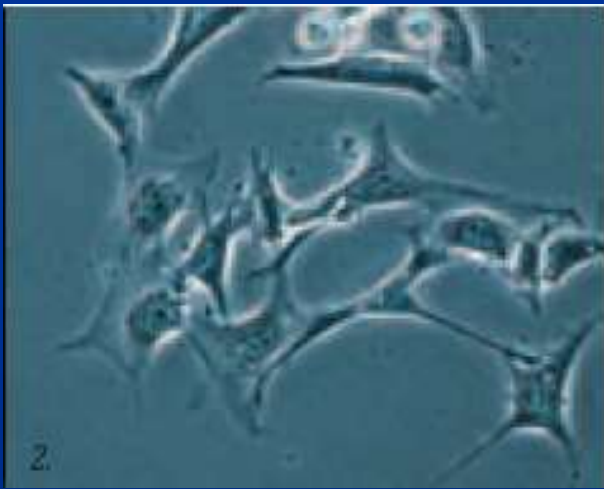
**Особенности: мощные источники света, чтобы компенсировать слабое рассеяние света нано-объектами**

**Область применения: коллоидная химия**

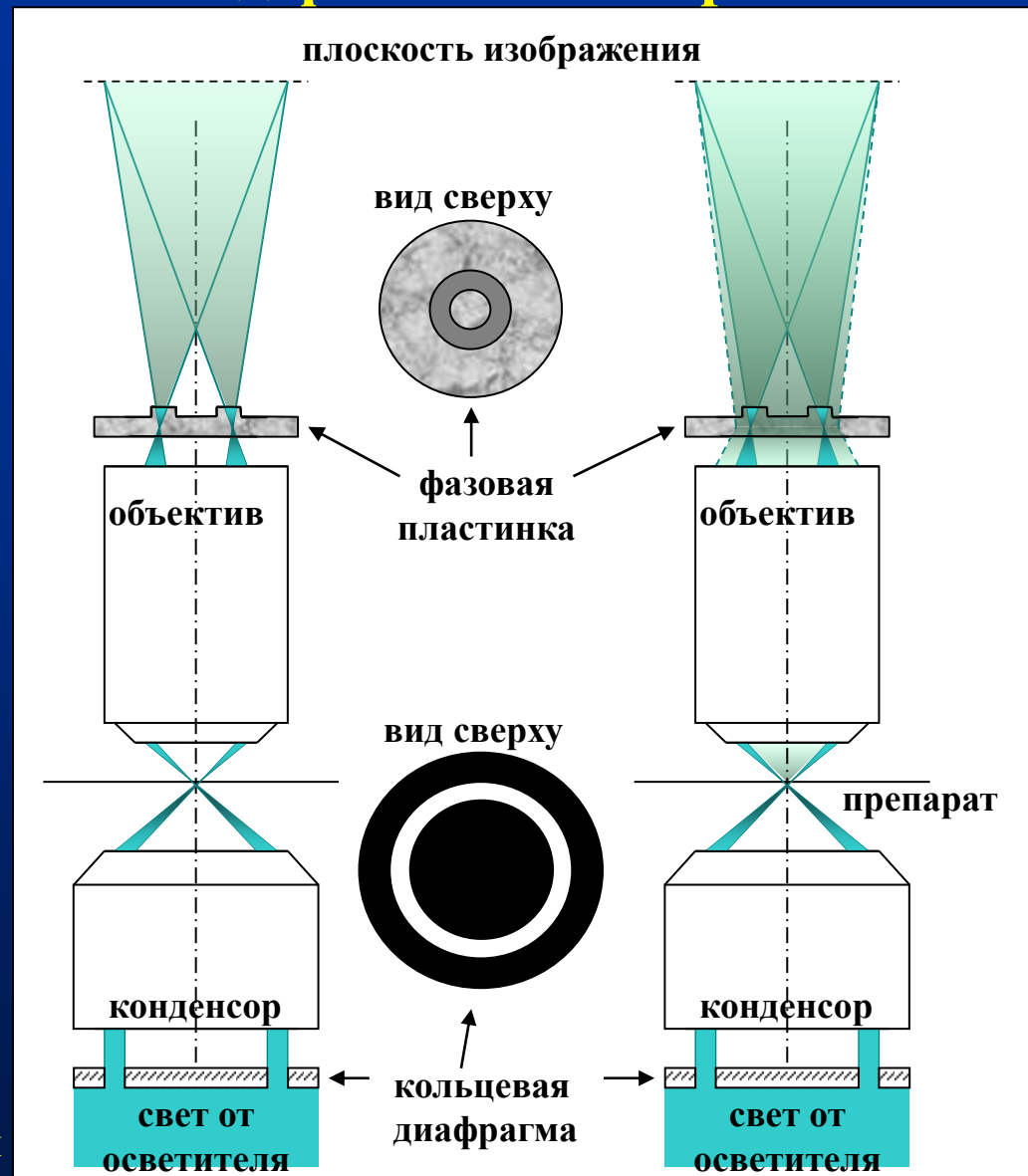


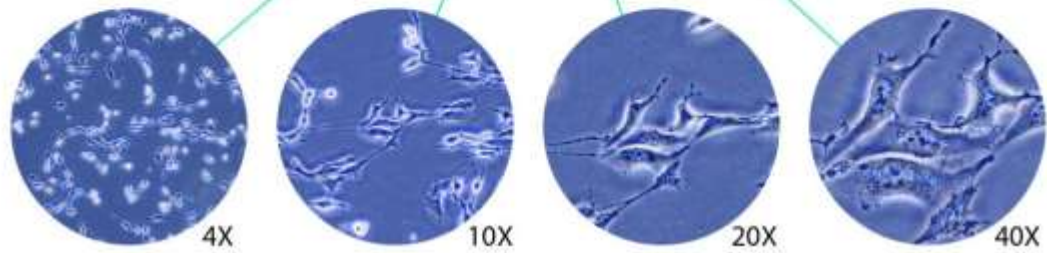
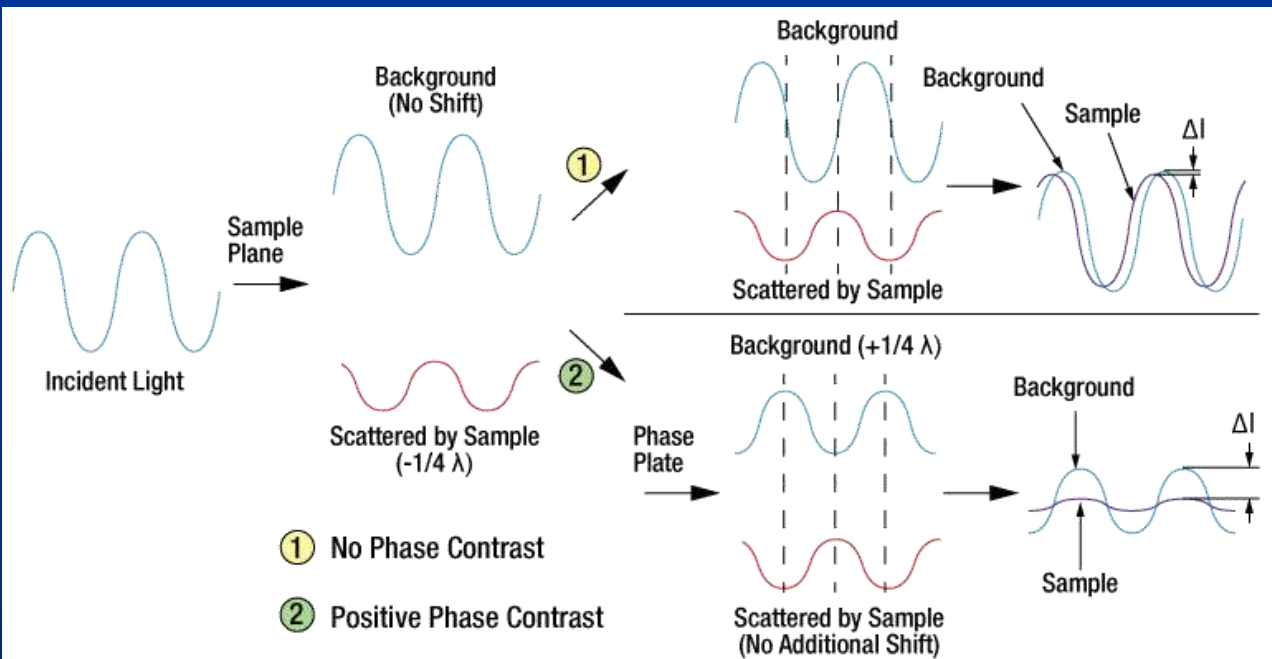
**Richard A. Zsigmondy**  
1925 Noble Prize  
Germany, Austria,  
1865-04-01 - 1929-09-29  
Colloid chemistry  
(ultramicroscope)

# Метод фазового контраста



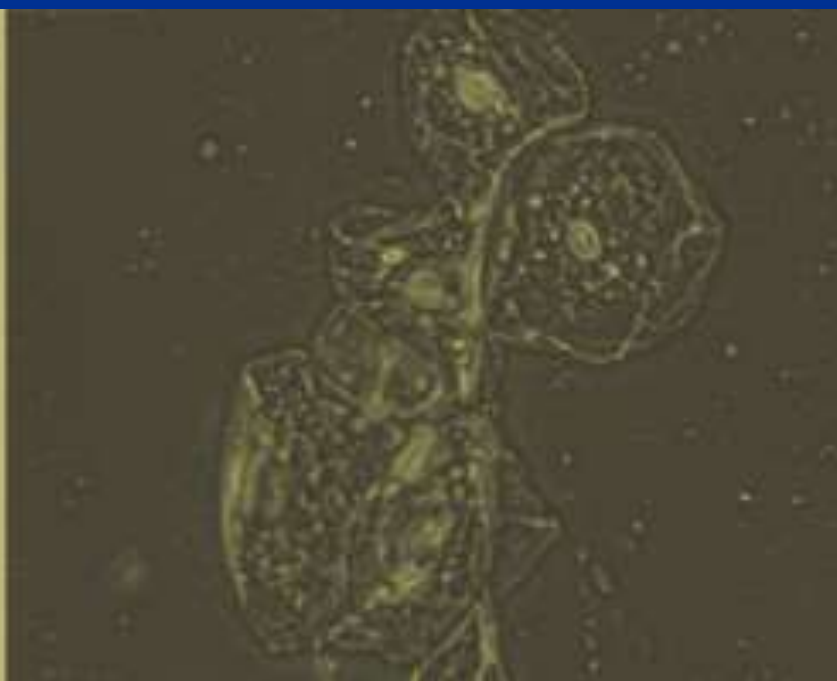
метод служит для получения изображений прозрачных и бесцветных объектов, невидимых при наблюдении по методу светлого поля







в проходящем свете

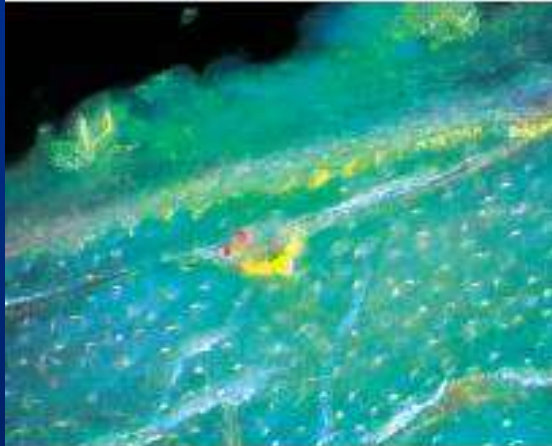


фазовый контраст



Срез кости при различных способах  
наблюдения  
метод «яркого поля»

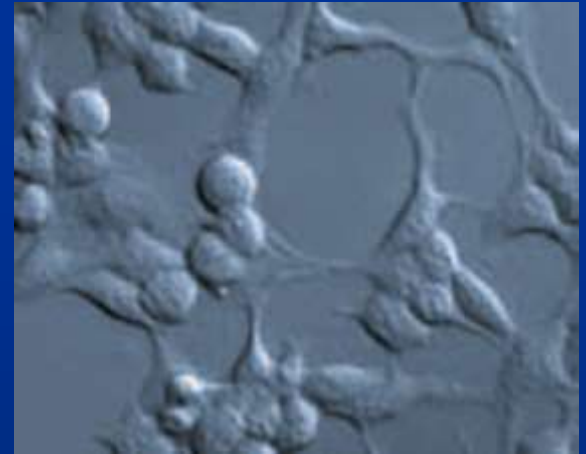
в проходящем или  
отраженном белом свете



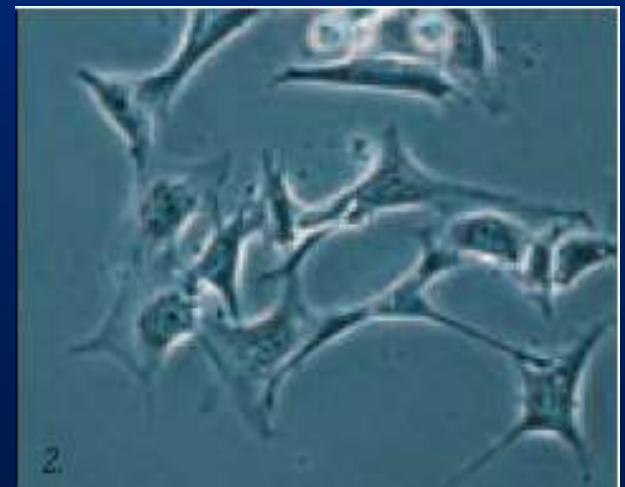
метод темного поля



метод фазового  
контраста



Микрофотография клеток,  
полученная с помощью метода  
дифференциального  
интерференционного контраста



Фазово-контрастное изображение